

Figure 2 Molecular mechanisms of cholesterol efflux from cells. Intracellular cholesterol is transported by Cdc42/N-WASP pathway and delivered to the surface of cells such as macrophages. The cholesterol is taken up by lipid-poor apolipoprotein (apo) A-I via ABCA1. Otherwise, it is taken up by small high-density lipoprotein (HDL) particles such as HDL₃ through passive diffusion or via some receptors/transporters. These include ABCG1, SR-BI, SR-BIII or GPI-anchored HDL-binding proteins.

Passaged skin fibroblasts obtained from human subjects have been frequently used as research tools in the fields of lipid and lipoprotein metabolism. Age-related alteration of cellular lipid metabolism has been reported in fibroblasts obtained from aged animals and humans, indicating that lipids such as cholesterol and ceramide accumulate in aged cells.⁹ One of the major characteristics of cultured aged cells is known to be an enlarged and flattened morphology with altered actin cytoskeletons.¹⁰ It has been reported that one of the major determinants for actin cytoskeletons is the *Rho*-GTPase family,^{11,12} which functions as a molecular switch regulating various cell-biological functions with the use of energy produced by the hydrolysis of guanosine 5'-triphosphate (GTP). From basic science perspectives, an increasing amount of evidence has been accumulated to show that the *Rho* family has multiple functions that involve not only the rearrangement of actin cytoskeletons but also the regulation of transcription, adhesion, cell motility, cell cycle and

vesicular transport (Fig. 3). However, the pathophysiological and clinical relevance of these small G proteins to human diseases have not yet been clarified.^{13,14}

Cdc42, a member of the *Rho*-GTPase family, was originally identified as a molecule responsible for the budding of yeast as well as the regulation of actin dynamics.^{11,12} We have recently reported that the expression of Cdc42 is reduced in association with the abnormal actin cytoskeletons in cells from patients with TD¹⁵ that is a model for the impairment of intracellular lipid transport and subsequent efflux from the cells.⁷ We demonstrated that Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells expressing dominant negative and active mutants of Cdc42 showed the reduced and increased cholesterol efflux, respectively.¹⁵ Based upon these data, we proposed that Cdc42 might play an important role in intracellular lipid trafficking and its export from the cells. Furthermore, we speculated that some of the *Rho*-GTPases could be involved in some

S Yamashita *et al.*

A Member of RhoGTPases, a Family of Ras Superfamily GTP-binding 20~30kDa Proteins

Experimental Studies indicated:

- A 'Kind of Molecular Switch
- GTP-binding Form Activates Effector Molecules

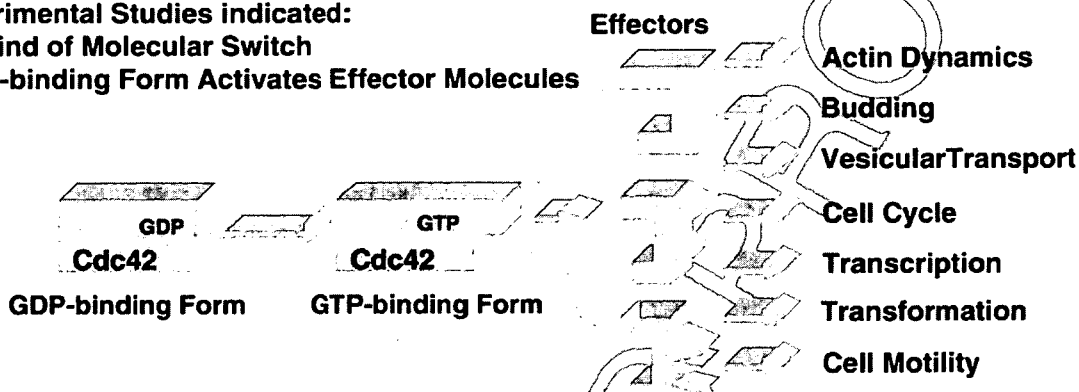


Figure 3 Multiple roles and effectors of Cdc42 involved in cellular functions:

of the cellular events in senescent cells with abnormal actin cytoskeletons. It was suggested that cytoskeletons such as actins and microtubules could play a role in the vesicular transport of proteins and lipids^{16,17} and that Cdc42 may play an important role in vesicular transport.^{11,12,18} Therefore, we aimed to determine whether intracellular lipid transport is altered in aged fibroblasts in association with a decreased expression of Cdc42. To analyze intracellular lipid transport, we used fluorescent recovery after photobleaching (FRAP), which is a powerful technique that is used to investigate the intracellular transport of lipids and proteins in living cells.¹⁹⁻²¹

Werner syndrome (WS), first described by Werner,²² is an autosomal recessive disorder that belongs to a category of diseases called human premature aging disorders.^{23,24} The patients with WS suffer from malignant neoplasmas and premature atherosclerosis in their 40s. Since the identification of the WRN locus on chromosome 8p responsible for WS,²⁵ the biochemical and biological studies have revealed that WRN protein has activities for DNA helicase, ATPase, and exonuclease.²⁶⁻²⁸ Some patients with WS exhibited low serum HDL-cholesterol levels and tendon xanthomatosis and abnormalities were observed in patients' macrophages.²⁹⁻³¹ However, the molecular mechanism underlying the premature atherosclerosis in WS patients is not yet fully understood. In the current review, we will focus on the impaired efflux of cholesterol from aged cells and WS fibroblasts and its molecular mechanism as a basis for age-related enhancement of atherosclerosis.

Impaired cholesterol efflux from aged cells and its molecular mechanism

Effect of in vivo and in vitro aging on the expression of immunoreactive mass of Cdc42 in human skin fibroblasts

The effect of *in vivo* aging on the expression of immunoreactive mass of Cdc42 in human skin fibroblasts was examined. The expression of Cdc42 declined with aging (Fig. 4).³² The expression of Cdc42 was significantly lower in the cell lines from the subjects aged more than 80 years than in the cell lines from control subjects. In addition to the expression levels of protein, the GTP-bound Cdc42 was significantly decreased in the cell lines from the subjects aged more than 80 years. Furthermore, the expression of Cdc42 was significantly decreased in the cells with higher population doubling levels (PDL), suggesting that the *in vitro* aging also induced a reduction of Cdc42.

Intracellular lipid transport in the aged cells was examined by using the FRAP method. We have tested the lateral mobility of lipids in the Golgi apparatus by FRAP with the use of a fluorescent ceramide (C6-NBD-ceramide) as a tracer. Previous studies reported that the kinetics of C6-NBD-ceramide closely reflect that of cholesterol.^{20,21,33} After incubation, C6-NBD-ceramide accumulated around the Golgi apparatus. After bleaching, the recovery of fluorescence intensity was monitored, and time constants were measured in the defined region. The time constants for recovery were significantly prolonged in the cell lines from the subjects aged

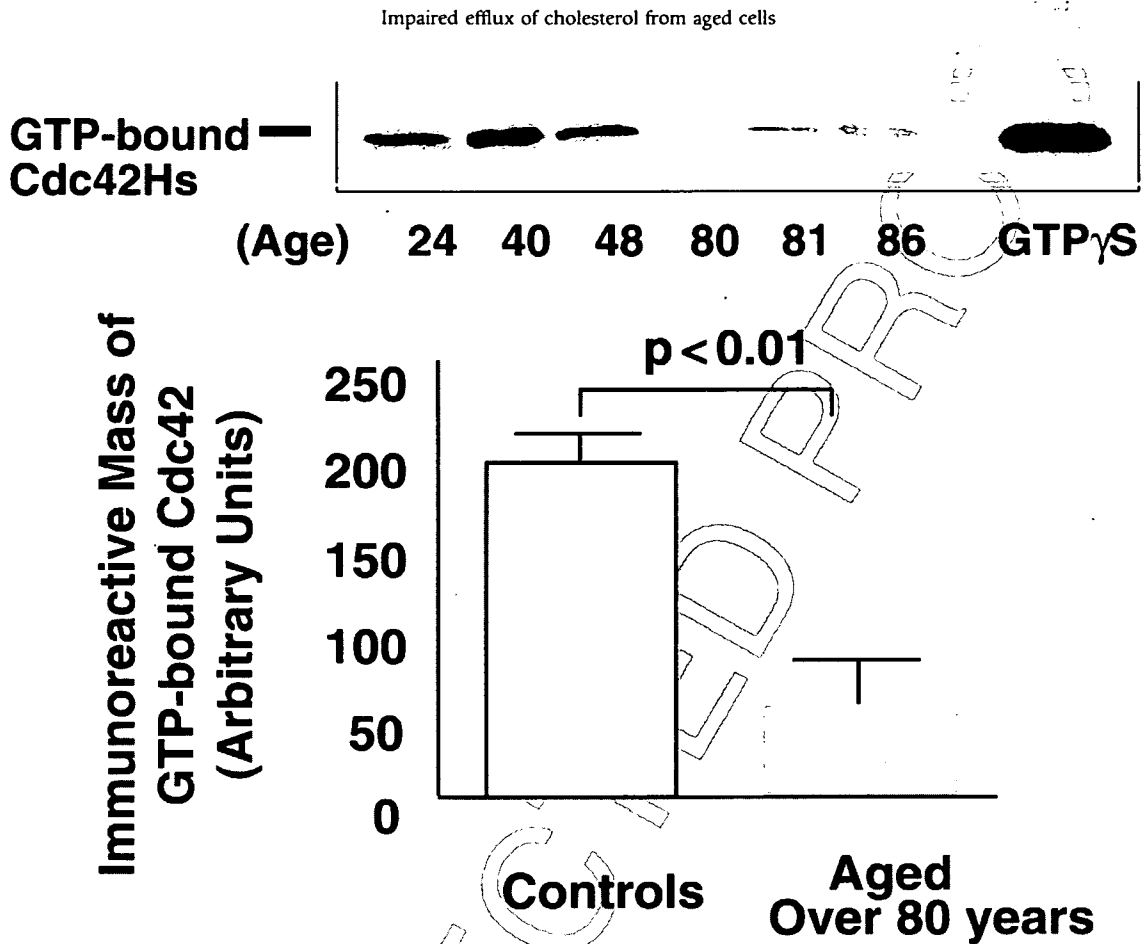


Figure 4 Effects of *in vivo* aging on expression of guanosine 5'-triphosphate (GTP)-bound active Cdc42 in fibroblasts. GTP-bound Cdc42 was assessed by Cdc42 activation assay when all cell lines were at population doubling level (PDL)²⁴. The expression of immunoreactive masses of GTP-bound Cdc42 in human fibroblasts was significantly reduced in the cell lines from aged subjects ($P < 0.01$). Reproduced from Tsukamoto *et al.*³² with permission from <publisher>.

more than 80 years compared with those of the control subjects. The time constants were also significantly prolonged in the cells with higher versus lower PDL. These data indicated that intracellular lipid transport in the Golgi apparatus was retarded in skin fibroblasts from aged human subjects as well as in the cells with *in vitro* aging.

Effect of adenovirus-mediated complementation of Cdc42 on retarded intracellular lipid transport and cholesterol efflux in aged human skin fibroblasts

Thus, we hypothesized that Cdc42 may regulate intracellular lipid transport in the aged fibroblasts. We introduced the following Cdc42 constructs into the cells by using adenovirus-mediated gene transfer. We made adenovirus vectors encoding the wild type of Cdc42Hs

(myc-Cdc42Hs-WT) as well as its dominant-active (myc-Cdc42Hs-DA) and dominant-negative (myc-Cdc42Hs-DN) forms. We confirmed the expression of the transgene by immunocytochemical analyses. Fibroblasts infected with adenovirus encoding myc-Cdc42-DA exhibited the development of filopodia formation, which was consistent with previous reports.^{11,12} Fibroblasts infected with adenovirus encoding myc-Cdc42-WT or -DN did not exhibit manifest morphological changes. However, we could observe that few cells strongly expressing myc-Cdc42-WT exhibited quite similar morphology with cells expressing myc-Cdc42-DA.

Finally, to elucidate the contribution of the decreased expression of Cdc42Hs to retarded intracellular lipid transport, we performed a FRAP analysis in the aged fibroblasts infected with the adenoviruses. The comple-

S Yamashita *et al.*

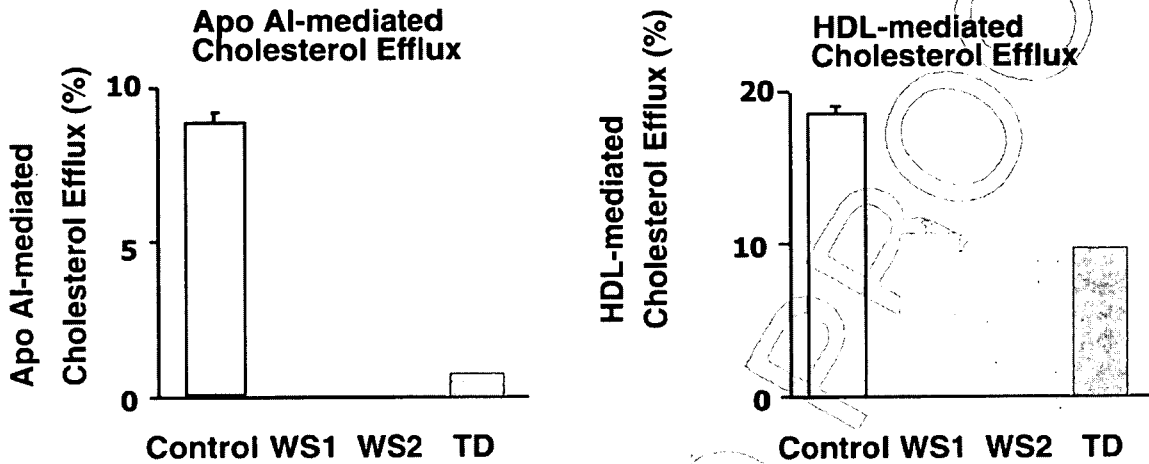


Figure 5 Defective cholesterol efflux from Werner syndrome fibroblasts. Apo A-I-mediated (left) and HDL₃-mediated (right) cholesterol efflux were both significantly reduced in Werner syndrome fibroblasts. Reproduced from Zhang *et al.*³⁵ with permission from <publisher>.

mentation of the wild-type Cdc42Hs corrected completely the retarded FRAP in the aged cells, whereas no significant differences of FRAP were observed between cells infected with and without adenovirus encoding LacZ. We also analyzed the effect of the introduction of myc-Cdc42-DA and -DN into these cells on intracellular lipid transport. The time constants were also significantly shortened by adenovirus-mediated introduction of myc-Cdc42-DA in the aged cells, whereas infection with myc-Cdc42-DN prolonged the time constants in the aged cells. FRAP was significantly retarded in control fibroblasts infected with adenovirus encoding myc-Cdc42Hs-DN compared to fibroblasts infected with adenovirus encoding LacZ. These results support the hypothesis that Cdc42Hs plays an important role in regulating intracellular lipid transport, suggesting a novel involvement of impaired Cdc42 in aging-associated progression of atherosclerosis.

We have recently demonstrated that ABCA1 and Cdc42 could co-localize and have a possible protein-protein interaction in the transfected cells.³⁴ These two molecules and others might synergistically work and contribute to the intracellular lipid transport as well as the exporting lipids from cells. It is important to know the mechanism for the decreased expression of Cdc42Hs as well as the reduction of GTP-bound Cdc42 in the aged cells. Because our preliminary data showed that Cdc42 mRNA appears to be decreased in those cells, the reduction in the immunoreactive mass of Cdc42 and GTP-bound Cdc42 could be explained at least in part by some alterations at mRNA levels. We reported that the expression levels of Cdc42 mRNA and protein were decreased in cells from patients with TD.

We could speculate the possibilities of involvement of telomerase, however, further studies are required to elucidate its molecular mechanisms. It is also important to know what kind of effectors of Cdc42 are involved in the intracellular lipid transport, because the *Rho* family members are believed to be a kind of molecular switch that activate the downstream effectors. Previous experimental studies have demonstrated that Cdc42 regulates a variety of essential cellular processes, including actin dynamics, cell cycle, gene transcription, adhesion and vesicular transport.

Impaired intracellular transport and efflux of cholesterol in fibroblasts from Werner syndrome

Marked reduction of cholesterol efflux in fibroblasts from Werner syndrome

As mentioned earlier, the patients with WS suffer from cardiovascular diseases due to an enhanced atherosclerosis. We wanted to determine whether cholesterol efflux may be impaired in WS.³⁵ We measured cholesterol efflux from the skin fibroblasts from two unrelated patients with WS using two common acceptors for cholesterol efflux. Apo A-I-mediated cholesterol efflux was markedly reduced by approximately 70% in the WS fibroblasts lines, as compared to normal fibroblasts (Fig. 5, left).³⁵ The HDL₃-mediated cholesterol efflux was also decreased in the WS cells (Fig. 5, right).³⁵ We also examined the cholesterol efflux from SV40-immortalized WS and normal fibroblasts. Similar data were obtained in the immortalized cells, showing the

Impaired efflux of cholesterol from aged cells

1 reduction in both apo A-I- and HDL₃-mediated choles-
2 terol efflux in the WS cells.

3 **Marked retardation of intracellular lipid kinetics in** 4 **WS fibroblasts**

5
6 We examined the intracellular lipid trafficking in the
7 living WS cells by the FRAP technique, using a fluores-
8 cent ceramide as a probe. After incubation, C6-NBD-
9 ceramide accumulated around the Golgi apparatus.
10 After bleaching, the recovery of fluorescence intensity
11 was monitored and time constants were measured in the
12 defined region. The time constants for recovery were
13 significantly prolonged in the WS fibroblasts compared
14 with those of controls, indicating that the intracellular
15 transport of lipids might be markedly retarded in the
16 WS fibroblasts.

17 18 **Increased intracellular cholesterol levels and** 19 **expression of cholesterol efflux-related molecules** 20 **in WS fibroblasts**

21 Cellular cholesterol contents were significantly
22 increased in WS fibroblasts compared with those of
23 control fibroblasts, which was due to the defective cho-
24 lesterol efflux from cells. To understand the underlying
25 mechanism for the impaired cholesterol efflux from WS
26 cells, the expression of cholesterol efflux-related mol-
27 ecules was analyzed. The expression of Cdc42 protein
28 was markedly reduced by 70% in the WS fibroblasts
29 compared with fibroblasts from normal subjects. The
30 GTP-bound active form of Cdc42 was also markedly
31 reduced in the WS fibroblasts. However, quantitative
32 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-
33 PCR) showed that Cdc42 mRNA levels in WS fibro-
34 blasts were not apparently changed compared with
35 normal fibroblasts. We analyzed the following two
36 major molecules involved in cholesterol efflux from the
37 cells. One was ABCA1, which is known to be a prereq-
38 uisite molecule for apo A-I-mediated cholesterol efflux.
39 RNase protection assay and Western blot analyses
40 revealed that neither ABCA1 mRNA nor protein was
41 altered in the WS fibroblasts. The other one was the
42 scavenger receptor class B type I (SR-BI), which was
43 shown to facilitate HDL₃-mediated cholesterol
44 efflux.^{36,37} However, we did not observe detectable SR-BI
45 protein in either normal or WS fibroblasts under the
46 same conditions.

47 48 **Introduction of wild-type Cdc42 corrected abnormal** 49 **lipid transport in WS fibroblasts**

50 To test whether the decreased expression of Cdc42 is
51 directly responsible for the defective cholesterol efflux,
52 we tested the effect of WT-Cdc42 introduction on apo
53 A-I- and HDL₃-mediated cholesterol efflux in the

normal as well as WS fibroblasts. We observed a dose-
54 dependent increase in apo A-I- and HDL₃-mediated
55 cholesterol efflux in the WS cells infected with
56 adenovirus-encoding Cdc42. In addition, in the normal
57 fibroblasts, the cholesterol efflux was significantly
58 increased. The introduction of WT-Cdc42 completely
59 corrected the abnormal intracellular kinetics of ceram-
60 ide in the WS fibroblasts. The effect of complemen-
61 tation of Cdc42 on cellular cholesterol content was
62 determined, and cellular cholesterol content was
63 decreased by introduction of WT-Cdc42. These data
64 demonstrated that the observed abnormalities in lipid
65 transport could be corrected by WT-Cdc42 without the
66 introduction of WRN protein.
67

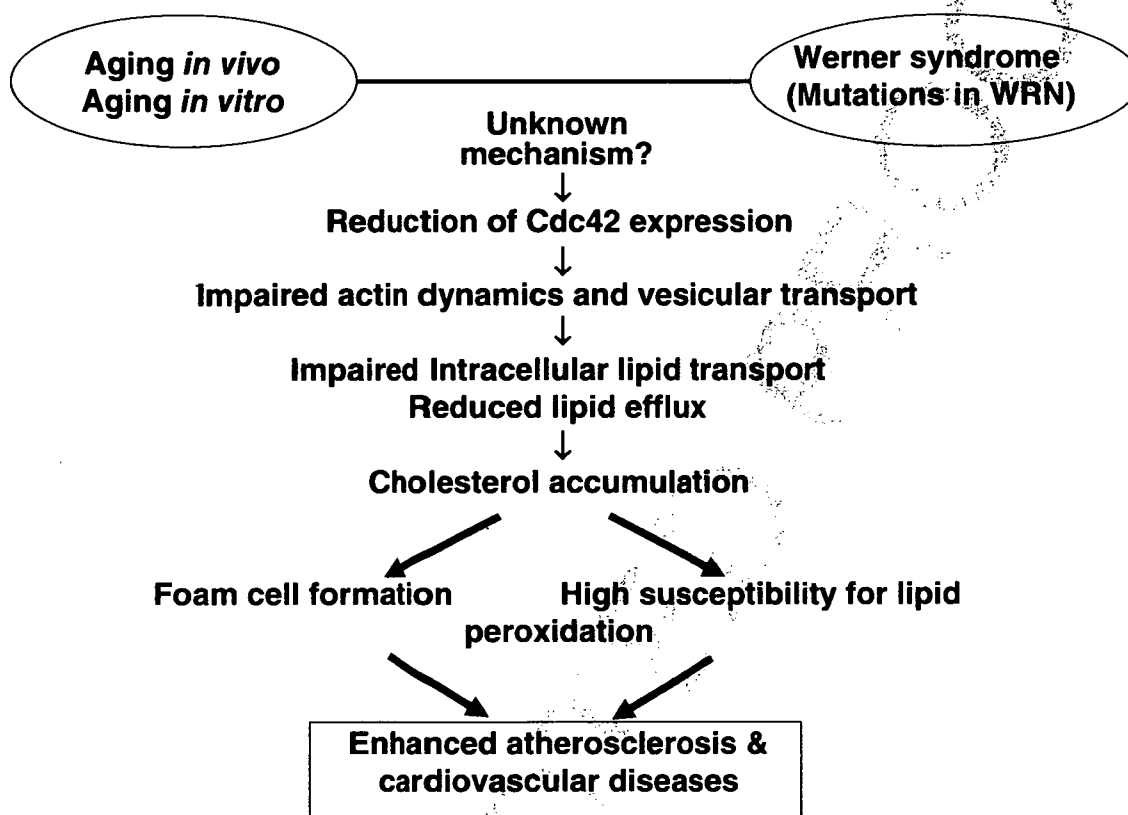
68 69 **Mechanism for impaired Cdc42-mediated** 70 **cholesterol efflux in Werner fibroblasts**

71 The molecular mechanisms for the premature athero-
72 sclerosis observed in WS patients are currently
73 unknown. The cells from WS were reported to exhibit
74 various cell-biological abnormalities such as genome
75 instability, reduced replicative capacity, shortened
76 telomere and hypersensitivities to DNA cross-linking
77 agents.³⁸ The current study has demonstrated the
78 marked reduction of apo A-I- and HDL₃-mediated cho-
79 lesterol efflux in the WS fibroblasts in association with
80 the decreased expression of Cdc42. However, this phe-
81 notype was mostly corrected by introducing WT-Cdc42.
82

83 **Is Cdc42 involved in cell-biological** 84 **properties of senescent cells and** 85 **age-related atherosclerosis?**

86
87 We have recently proposed that Cdc42 may be impor-
88 tant for lipid transport, based on our finding that
89 MDCK cells expressing dominant active and negative
90 forms of Cdc42 display a respective increase and
91 decrease in cholesterol efflux.¹⁵ Following this report,
92 other researchers also reported that Cdc42 might be
93 involved in cholesterol efflux.^{39,40} Furthermore, we dem-
94 onstrated that Cdc42 may play an important role in
95 intracellular lipid transport in the aged fibroblasts *in*
96 *vitro* and *in vivo*.³² Because Cdc42 regulates not only
97 actin dynamics but vesicular transport, we speculate
98 that vesicular transport may be involved in the process
99 for cholesterol efflux.^{41,42} The mechanism for the reduc-
100 tion of Cdc42 protein in both aged and WS fibroblasts
101 remains to be investigated. We recently reported that
102 Cdc42 protein was decreased in fibroblasts from
103 patients with TD. TD fibroblasts show properties of
104 senescent cells such as slow proliferation, increased cell
105 size and decreased filopodia. In these cells, Cdc42
106 mRNA was also decreased. In contrast, the level of
107 Cdc42 mRNA was not altered in the WS fibroblasts,

S Yamashita *et al.*



1 **Figure 6** Molecular mechanisms for enhanced atherosclerosis and cardiovascular diseases associated with aging. Reduction of
2 Cdc42 may play a pivotal role in the impaired intracellular lipid transport and reduction of cholesterol efflux from cells.

3
4 suggesting that post-transcriptional regulation is
5 involved. Because WRN protein is multifunctional in
6 regulating recombination, transcription and apoptosis,
7 WRN protein could directly regulate the protein expres-
8 sion of Cdc42.

9 The molecular characteristics of WRN protein as
10 DNA helicase have been extensively studied, however,
11 there are many issues to be clarified, including the
12 molecular mechanism for premature atherosclerosis
13 and accelerated aging in WS. The adenovirus-mediated
14 complementation of Cdc42 corrected the abnormal
15 intracellular lipid transport, cholesterol efflux and cho-
16 lesterol accumulation. Taken together, the following
17 hypothesis can be proposed. The reduction of Cdc42
18 may cause abnormal intracellular lipid transport and
19 lipid efflux, leading to the accumulation of cellular
20 cholesterol.

21 Furthermore, Cdc42 is known to bear some essential
22 cell-biological activities including regulation of actin
23 dynamics, cell cycle, transformation and vesicular trans-
24 port other than lipid transport. It is possible that the

25 decreased expression levels Cdc42 could be involved in
26 the development of age-related enhancement of athero-
27 sclerosis and premature aging phenotypes of WS. The
28 reduction of Cdc42 protein was observed in cells from
29 normal aged-subjects and those from patients with TD.
30 We recently found that fibroblasts from TD patients
31 exhibited cellular senescence (unpubl. data). Taken
32 together, the reduction of Cdc42 protein might be a
33 general problem in cellular senescence and a back-
34 ground for age-related enhancement of atherosclerosis
35 in humans (Fig. 6).
36

Acknowledgements

37

38 We thank Dr Yoshimi Takai (Department of Molecular
39 Biology and Biochemistry, Osaka University, Osaka,
40 Japan) for providing us with Cdc42 constructs. This
41 work was supported by Grants-in-Aid to S. Yamashita
42 (nos. 11557055 and 10671070) and K. Hirano (no.
43 13671191) from the Ministry of Education, Science,
44

Impaired efflux of cholesterol from aged cells

Sports, and Culture of Japan. The present study was supported by the Japan Society for the Promotion of Science to S. Yamashita and Z. Zhang, and a grant from the Novartis Foundation for Gerontological Research and a grant from the Ono Medical Foundation to S. Yamashita, and partially by the International HDL Research Award (Pfizer) to S. Yamashita.

References

1 Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 2000; 104: 503–516.
2 Bennett MR, Macdonald K, Chan SW, Boyle JJ, Weissberg PL. Cooperative interaction between RB and p53 regulates cell proliferation, cell senescence, and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques. *Circ Res* 1998; 82: 704–712.
3 Vasile E, Tomita Y, Brown LF, Kocher O, Dvorak HF. Differential expression of thymosin β -10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis. *FASEB J* 2001; 15: 458–466.
4 Kockx MM. Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 18: 1519–1522.
5 Glomset JA. The plasma lecithin: cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 1968; 9: 155–167.
6 Tall AR. An overview of reverse cholesterol transport. *Eur Heart J* 1998; 19 (Suppl A): A31–A35.
7 Nishida Y, Hirano K, Tsukamoto K *et al.* Expression and functional analyses of novel mutations of ATP-binding cassette transporter-1 in Japanese patients with high-density lipoprotein deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 290: 713–721.
8 Brewer HB Jr, Remaley AT, Neufeld EB, Basso F, Joyce C. Regulation of plasma high-density lipoprotein levels by the ABCA1 transporter and the emerging role of high-density lipoprotein in the treatment of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1755–1760.
9 Park WY, Park JS, Cho K *et al.* Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signalling in senescent cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 20847–20852.
10 Van Gansen P, Van Lerberghe G. Potential and limitations of cultivated fibroblasts in the study of senescence in animals: a review on the murine skin fibroblasts system. *Arch Gerontol Geriatr* 1998; 7: 31–74.
11 Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; 279: 509–514.
12 Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001; 81: 153–208.
13 Laufs U, Liao JK. Targeting Rho in cardiovascular disease. *Circ Res* 2000; 87: 526–528.
14 van Nieuw Amerongen GP, van Hinsinger VWM. Cytoskeletal effects of Rho-like small guanine nucleotide-binding proteins in the vascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 300–311.
15 Hirano K, Matsuura F, Tsukamoto K *et al.* Decreased expression of a member of Rho GTPases family, Cdc42Hs, in cells from Tangier disease: the small G protein may play a role in cholesterol efflux. *FEBS Lett* 2000; 484: 275–279.
16 Der CJ, Balch WE. GTPases traffic control. *Nature* 2001; 405: 749–752.
17 Olkkonen VM, Ikonen E. Genetic defects of intracellular-membrane transport. *N Engl J Med* 2000; 343: 1095–1104.

18 Kroschewski R, Hall A, Mellman I. Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 8–13.
19 Reits EAJ, Neefjes JJ. Form fixed, to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat Cell Biol* 2001; 3: E145–E148.
20 Orso E, Broccardo C, Kaminski WE *et al.* Transport of lipids from Golgi to plasma membrane is defective in Tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat Genet* 2000; 24: 192–196.
21 Schmitz G, Goetz A, Orso E, Rothe G. Fluorescence recovery after photobleaching measured by confocal microscopy as a tool for the analysis of vesicular lipid transport and plasma membrane mobility. *Proc SPIE* 1998; 3260: 127–135.
22 Werner O. On cataracta associated in conjunction with scleroderma. Doctoral Dissertation. Kiel University, Schmidt and Klaunig, Kiel, 1904.
23 Brosh RM Jr, Bohr VA. Roles of the Werner syndrome protein in pathways required for maintenance of genome stability. *Exp Gerontol* 2002; 37: 491–506.
24 Chen L, Oshima J, Werner syndrome. *J Biomed Biotechnol* 2002; 2: 46–54.
25 Yu GE, Oshima J, Fu YH *et al.* Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 1996; 272: 258–262.
26 Balajee AS, Machwe A, May A *et al.* The Werner syndrome protein is involved in RNA polymerase II transcription. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 2655–2668.
27 Gray MD, Shen JC, Kamath-Loeb AS *et al.* The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nat Genet* 1997; 17: 100–103.
28 Suzuki N, Shiratori M, Goto M, Furuichi Y. Werner syndrome helicase contains a 5' \rightarrow 3' exonuclease activity that digests DNA and RNA strands in DNA/DNA and RNA/DNA duplexes dependent on unwinding. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 2361–2368.
29 Kobayashi J, Murano S, Yokote K *et al.* Marked decrease in plasma apolipoprotein A-I and high density lipoprotein-cholesterol in a case with Werner syndrome. *Clin Chim Acta* 2000; 293: 63–73.
30 Mori S, Morisaki N, Saito Y, Yoshida S. Metabolism of acetylated low density lipoproteins by monocyte-derived macrophages from patients with Werner's syndrome. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 644–649.
31 Mori S, Yokote K, Morisaki N, Saito Y, Yoshida S. Inheritable abnormal lipoprotein metabolism in Werner's syndrome similar to familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 1990; 20: 137–142.
32 Tsukamoto K, Hirano K, Yamashita S *et al.* Retarded intracellular lipid transport associated with reduced expression of Cdc42, a member of Rho-GTPases, in human aged skin fibroblasts: a possible function of Cdc42 in mediating intracellular lipid transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1899–1904.
33 Martin OC, Comly ME, Blanchette-Mackie EJ, Pentchev PG, Pagano RE. Cholesterol deprivation affects the fluorescence properties of a ceramide analog at the Golgi apparatus of living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2661–2665.
34 Tsukamoto K, Hirano K, Tsujii K *et al.* ATP-binding cassette transporter-1 (ABCA1) induces rearrangement of actin cytoskeletons possibly through Cdc42/N-WASP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287: 757–765.
35 Zhang Z, Hirano K, Tsukamoto K *et al.* Defective cholesterol efflux in Werner syndrome fibroblasts and its phenotypic correction by Cdc42, a RhoGTPase. *Exp Gerontol* 2005; 40: 286–294.

S Yamashita *et al.*

- 1 36 Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996; **271**: 518-520.
- 2
3
4
5 37 Hirano K, Yamashita S, Nakagawa Y *et al.* Expression of human scavenger receptor class B type I in cultured human monocyte-derived macrophages and atherosclerotic lesions. *Circ Res* 1999; **85**: 108-116.
- 6
7
8 38 Opresko PL, Cheng W-H, von Kobbe C, Harrigan JA, Bohr VA. Werner syndrome and the function of the Werner protein; what they can teach us about the molecular aging process. *Carcinogenesis* 2003; **24**: 791-802.
- 9
10 39 Diederich W, Orso E, Drobnik W, Schmitz G. Apolipoprotein AI and HDL3 inhibit spreading of primary human monocytes through a mechanism that involves cholesterol depletion and regulation of Cdc42. *Atherosclerosis* 2001; **159**: 131-324.
- 11
12
13
14
15 40 Nofer JR, Feuerborn R, Levkau B, Sokoll A, Seedorf U, Assmann G. Involvement of Cdc42-signaling in apolipoprotein AI-induced cholesterol efflux. *J Biol Chem* 2003; **278**: 53055-53062.
- 16
17
18
19
20
21 41 Engel T, Lueken A, Bode G *et al.* ADP-ribosylation factor (ARF)-like 7 (ARL7) is induced by cholesterol loading and participates in apolipoprotein AI-dependent cholesterol export. *FEBS Lett* 2004; **566**: 241-246.
- 22
23
24
25
26
27 42 Kroschewski R, Hall A, Mellman I. Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane MDCK cells. *Nat Cell Biol* 1999; **1**: 8-13.
- 28

基礎

メタボリックシンドロームの遺伝的素因

後藤田 貴也*

要 旨

メタボリックシンドロームに特徴的な異常はいずれも遺伝形質であり、メタボリックシンドローム自体も多因子遺伝性疾患の1つである。因子分析の結果、メタボリックシンドロームはそれぞれに高い遺伝度を有する3～4個以上の独立した病態を内包するものと考えられる。ゲノムワイド連鎖解析の結果を中心として、メタボリックシンドロームの疾患感受性を規定する幾つかの候補遺伝子と染色体領域が明らかになりつつある。メタボリックシンドロームの遺伝素因の解明は、その正確な診断と効果的な臨床介入に重要である。

はじめに

メタボリックシンドロームとは、何らかの共通の成因的基盤のもとに複数の冠血管危険因子が重複し、高率に心血管疾患を引き起こす病態と定義できる。近年、メタボリックシンドロームという臨床概念が新たに提唱されるに至った背景には、糖尿病や高血圧、高コレステロール血症などの既存の単独の危険因子を管理対象とした場合に漏れてしまうハイリスク集団のスクリーニングの必要性があった。ところが、現行の診断基準¹⁾²⁾に従った場合のメタボリックシンドロームの心血管リスクの増大はせいぜい3倍程度³⁾と、既存の単独の危険因子によるリスク増大とほぼ同程度にとどまり、新たなハイリスク群の予測因

子として十分とは言えない。その原因として、メタボリックシンドロームの成因が必ずしも明らかではないことに加えて、メタボリックシンドロームが単一の病態ではないことが挙げられる。本稿では、遺伝的な側面からメタボリックシンドロームの成因と病態に関して考察を加えたい。

メタボリックシンドロームの
遺伝因子の存在

双生児研究は疾患や表現型の遺伝度 (heritability) を調べる最も基本的な方法であるが、メタボリックシンドロームに関する双生児研究の結果によると、メタボリックシンドロームに特徴的な糖、脂質、血圧、および体重の異常はいずれも高い遺伝度 (0.52～0.80) を持つ遺伝形質であることが示されている⁴⁾。このことから、メタボリックシンドロームは生活習慣 (環境因子) と複数の遺伝因子 (疾患感受性遺伝子) がその発症に関与する、い

* 東京大学大学院医学系研究科 臨床分子疫学 助教授
キーワード: メタボリックシンドローム,
インスリン抵抗性, 遺伝子, 因子分析,
連鎖解析

図1 因子分析によるメタボリックシンドロームの構成因子の抽出

Kaiser Permanente Women Twin Study	Framingham Offspring Study	Strong Heart Study of American Indians	Honolulu Heart Program of Japanese American	Japanese American Community Diabetes Study
体重	BMI	BMI	体重	中性脂肪
脂肪分布	W/H 比	グルコース	胸囲	HDL-C
	インスリン	インスリン	インスリン	LDL 粒子径
グルコース	中性脂肪			
インスリン	HDL-C	血圧	グルコース	胸囲
			インスリン	グルコース
血圧	グルコース	インスリン		インスリン
	インスリン	中性脂肪	血圧	CRP
中性脂肪		HDL-C		
HDL-C	BMI		中性脂肪	血圧
	血圧		HDL-C	

■：肥満関連因子，■：糖代謝関連因子，■：高血圧関連因子，■：脂質代謝関連因子
略語：巻末の「今月の略語」参照

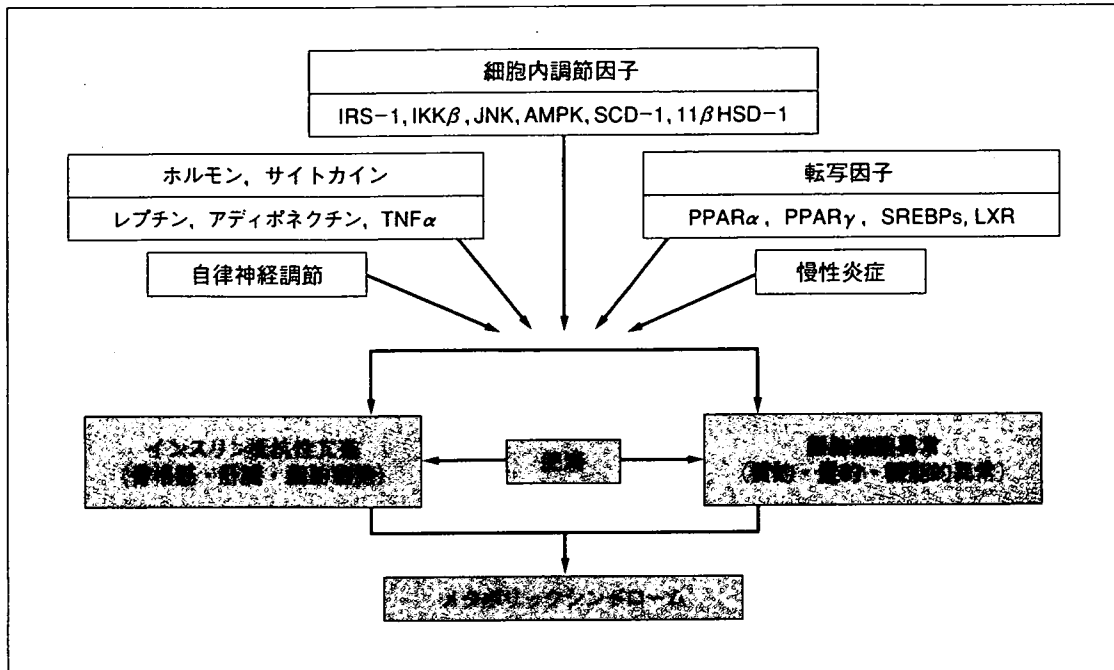
いわゆる多因子遺伝性疾患（複合遺伝形質）の1つであると考えられる。

一方、多因子遺伝性疾患としての観点からメタボリックシンドロームの遺伝的な構成因子を調べた報告が数多くなされている。因子分析（factor analysis）は、体重や血圧、インスリン値といった互いに関連の深い量的形質を幾つかの独立した因子のもとに抽出する多変量解析法の一つであるが、本法によってこれまでに20以上の大規模な疫学調査データが解析されている。その結果はいずれも、メタボリックシンドロームは少なくとも3～4個以上の互いに独立した構成因子（component）からなることを示している（図1）。すなわち、メタボリックシンドロームは遺伝的な観点から見て単一の病態ではなく、それぞれに高い遺伝度を有する少なくとも3～4個以上の独立した病態を内包するものと考えられる。このことは、遺伝的に日本人とほぼ同一である日系米国人の集団を対象とした研究（図1の右2つ）においても示されている。

因子分析の問題点

因子分析の結果では、インスリンが糖や脂質、肥満といった複数の因子と同時に抽出される（図1）ことから、やはりインスリン抵抗性が危険因子重複の背景に存在することが示唆される。また、各因子の中で血圧関連因子が単独で抽出される場合が多いことより、メタボリックシンドロームの中において血圧の異常は他の異常とは成因上やや異なった位置づけにあるとの主張もなされている⁵⁾。しかし一方で、メタボリックシンドロームの成因を探る目的で因子分析が多用されている現状に対して、批判的な意見も出されている⁶⁾。すなわち、因子分析は本来、生物学的な証拠に基づいて構築された仮説を検証する目的には非常に有用であるが、疫学データをもとに生物学的な成因や経路を探ったり、仮説を導く目的で用いるのは危険であるとの批判である。さらに血圧に関しても、収縮期血圧と拡張期血圧のように互いに非常に密接に関連す

図2 メタボリックシンドロームの原因となる標的因子



略語：巻末の「今月の略語」参照

る因子を同時に解析に加える誤りが、血圧関連因子が単独で抽出されてしまう理由であることが指摘されている。よって、因子分析の結果は慎重に解釈しなければならないが、メタボリックシンドロームが内包する異なった病態がそれぞれに持つ遺伝的背景を明らかにすることが、メタボリックシンドロームのより正確な診断と効果的な臨床介入に重要であることは明白である。

メタボリックシンドロームの候補遺伝子

Reaven 以来、メタボリックシンドロームの成因的基盤をなすものとして「インスリン抵抗性の亢進」が注目されている⁷⁾。例えば、インスリンシグナル伝達機構の1分子を欠損するマウスでは、骨格筋を中心としたインスリン抵抗性の亢進に加え、メタボリックシンドロームに特徴的な脂質代謝異常と高血圧を呈することが報告されている⁸⁾。また、脂肪細胞はインスリン感受性や糖・脂質代謝、血

圧の調節にあずかるさまざまな生理活性物質（アディポサイトカイン）を産生しており、脂肪細胞自体の異常もインスリン抵抗性やメタボリックシンドロームの発現を規定・修飾する因子であることが示されている。このようなメタボリックシンドロームの原因となる標的因子（図2）に関連する遺伝子は、メタボリックシンドロームの疾患感受性を規定する有力な候補遺伝子である。実際に、多数の候補遺伝子上の変異や多型とメタボリックシンドロームに関連する表現型との間で広く相関研究（association study）が行われ、複数の表現型との間に有意な相関が見られる遺伝子が幾つか報告されている（表1）。これらの中で、PPAR γ 遺伝子の Prol2Ala 多型は2型糖尿病の発症リスクを25%程度増加するとされ、これは日本人においても確認されている⁹⁾。また、アディポネクチン遺伝子の Ile164Thr 変異が日本人において低アディポネクチン血症と糖尿病に関連し、メタ

表1 メタボリックシンドローム関連遺伝子

遺伝子名	染色体上の局在	多型 / 変異	関連する表現型
LMNA (ラミン A/C)	1q21	H566H	TG, HDL & MS
CAPN10 (カルパイン 10)	2q37	SNP-43	BS, TG (肥満者で)
PPARG (PPAR γ)	3p25	P12A	TG, HT, IR & MS
Adiponectin (アディポネクチン)	3q27	I164T	MS
GCCR (グルココルチコイド受容体)	5q31	RFLP	Ob, HT, IR
ADRB2 (β_2 アドレナリン受容体)	5q32-34	G16R	MS (男性で)
NOS3 (内皮依存性 NO 合成酵素)	7q36	7164G-T, D298D	HT & MS
INS (インスリン)	11p15	RFLP	TG & MS
APOC3 (アポタンパク質 C3)	11q23	455T-C	TG, Ob & MS
APOC3/A4/A5 (アポタンパク質 C3/A4/A5)	11q23	SNP	Ob, HT, IR, TG
INPPL1 (SHIP2)	11q23	SNP	HT & MS
GNB3 (G タンパク質 β_3 サブユニット)	12p13	C825T	HT & MS
UBL5 (BEACON)	19p13	SNP	BS, TG, Ob
PPARA (PPAR α)	22q12-13	L162V	TG, HDL, Ob

その他の遺伝子: ADIPOR1 (アディポネクチン受容体1型), ADRB3 (β_3 アドレナリン受容体), LEP (レプチン), LPL (リポタンパク質リパーゼ), PTP1B (タンパク質チロシン脱リン酸化酵素 1B), UCP1 & 2 (脱共役タンパク質 1 & 2)

SNP: 単一塩基多型, RFLP: 制限酵素切断断片長多型, TG: 高トリグリセリド血症,

HDL: 低 HDL コレステロール血症, MS: その他のメタボリックシンドロームの表現型, BS: 糖代謝異常,

HT: 高血圧, IR: インスリン抵抗性, Ob: 肥満

ボリックシンドロームおよび冠動脈疾患とも関連する可能性が報告されている¹⁰⁾.

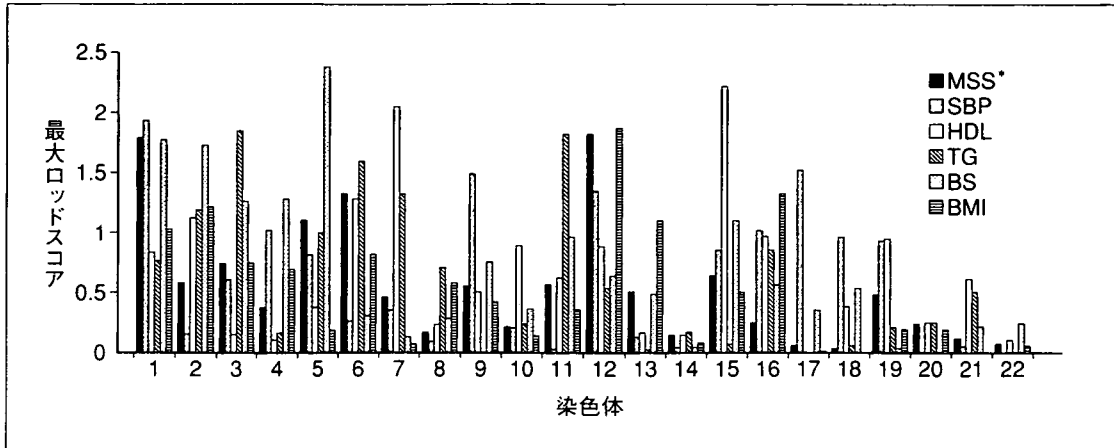
ゲノムワイド連鎖解析による 原因遺伝子座の探索

家系内や集団中で複数の遺伝子座が同時に分離 (遺伝) されていく現象を連鎖 (linkage) と呼び、それは各遺伝子座が同一染色体上の近傍に位置することを意味する。この「連鎖」の概念に基づき、遺伝子マーカーと原因遺伝子との間の組み換え率から原因遺伝子の染色体上の位置を推定する方法が連鎖解析法である。ヒトゲノムの解読により、ゲノム全体に高密度に散在するマイクロサテライトマーカーや単一塩基多型 (SNP) などの遺伝子多型のカタログ化が進み、ゲノム全体を俯瞰した連鎖解析や相関解析が可能となりつつある。

1. 複数の形質を同時に対象とした解析

Framingham Heart Study の登録者を対象に、メタボリックシンドロームに関連する5つの形質 (収縮期血圧, トリグリセリド, HDL コレステロール, 血糖値, BMI) およびこれら5つを複合した形質 (メタボリックシンドロームスコア: MSS と定義) に対して、マイクロサテライトマーカーを用いた全ゲノム解析を行った結果が最近報告されている (この場合の対象形質はすべて数量化可能なものであるため、量的形質遺伝子座: QTL 解析とも呼ばれる)¹¹⁾。その結果、おのおの形質や MSS に比較的弱い連鎖を示すピークが幾つかの染色体に散在して見られたが、ロッドスコアで 3.3 以上とされる有意 (significant) な連鎖は認められず、1.9 以上とされる示唆的 (suggestive) な連鎖がわずかに認められた (図3)。各形質および MSS の

図3 メタボリックシンドロームとその形質に関する QTL ゲノム解析の結果 (文献¹⁾より引用改変)



* MSS とは、SBP、HDL、TG、BS、BMI の5つの形質に関する標準誤差を総和し、年齢および性別で補正したものと定義。

SBP：収縮期血圧、HDL：HDL コレステロール、TG：トリグリセリド、BS：血糖値、BMI：体格指数

表2 各形質の遺伝度、最大ロッドスコア、QTL 領域 (Framingham Heart Study)

(文献¹⁾より引用改変)

形質	遺伝度	ロッドスコア	QTL (領域)	cM**
収縮期血圧	0.48	1.93	1p31	97
HDL コレステロール	0.62	2.27	15p13-q11	1
トリグリセリド	0.56	1.85	3p26	9
血糖値	0.39	2.37	5pter	0
体格指数 (BMI)	0.51	1.86	12q21	85
メタボリックシンドロームスコア (MSS)*	0.61	1.82	12q13	63

* MSS は、上記5つの形質に関する標準誤差を総和し、年齢および性別で補正したものと定義。

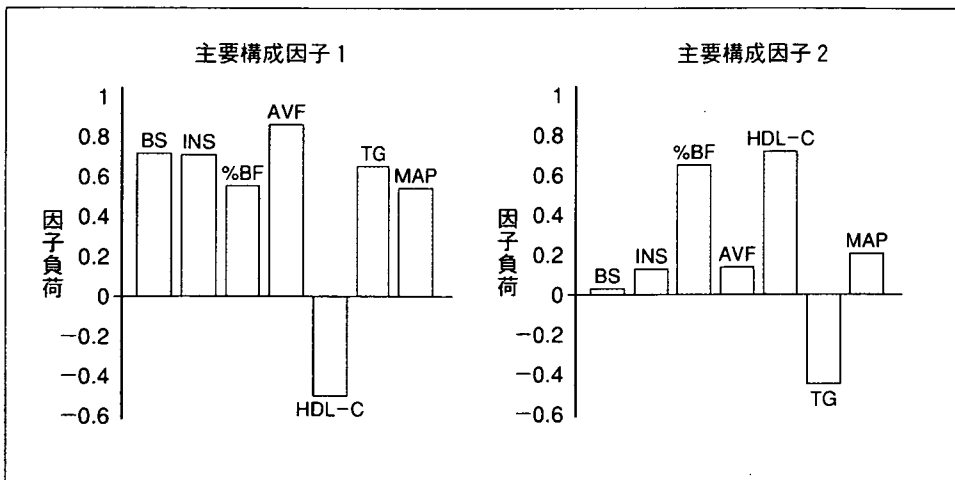
** 染色体の短腕端からの距離、cM：センチモルガン。

略語：巻末の「今月の略語」参照

遺伝度はやはり 0.39~0.62 と高く、特に5つの形質を合算した MSS の遺伝度が 0.61 と極めて高いことは、メタボリックシンドロームの成立に遺伝因子が大きく関与していることを示すものである。しかし一方連鎖のピークに関しては、血糖値、HDL コレステロール、収縮期血圧のおおのの最大ロッドスコアがそれぞれ 2.37、2.27、1.93 と、示唆的なレベルの連鎖が確認されたのに対して、MSS では 1.82 とむしろそれらを下回るロッドスコアしか得られていない (表2)。言い換えるとこの結果は、メタボリックシンド

ロームの診断基準に用いられる5つの形質に関して、それらの組み合わせや重みづけに関する考慮をせずに単純にその総和をもってメタボリックシンドロームを定義するとすれば、遺伝因子の検出力はおおのの形質単独の場合に比べて必ずしも改善されないことを示している。これは、「メタボリックシンドロームは複数の独立した構成因子 (病態) からなる」という因子分析の結果に合致し、今後メタボリックシンドロームの遺伝解析を行ううえでは、各構成因子に焦点を合わせた解析が重要になるものと思われる。このように

図4 メタボリックシンドロームの主要因子分析の結果 (HERITAGE Family Study)
(文献¹²⁾より引用改変)



BS：血糖，INS：インスリン，%BF：体脂肪率，AVF：腹部内臓脂肪，
HDL-C：HDL コレステロール，TG：トリグリセリド，MAP：平均動脈圧

メタボリックシンドロームは複数の独立した構成成分からなるため、何に重点を置くかによって解析対象が異なり、その結果同定される疾患感受性遺伝子も異なり、また解析対象となる人種の違いも結果に大きな影響を及ぼしうるなど注意が必要である。

2. 構成因子を対象とした解析例

メタボリックシンドロームに注目したゲノムワイド連鎖解析は、従来は上記のようにメタボリックシンドロームに関連した複数の形質を同時に対象としたものが主であったが、最近では、因子分析によって抽出された各構成因子を解析対象として、全ゲノムワイド連鎖解析を行ったものも報告されつつある。HERITAGE Family Study における 456 人の白人および 217 人の黒人を対象とした、そのような研究結果が報告されている¹²⁾。まず、因子分析の結果 2 つの主要な構成因子が抽出され、主要因子 1 は図 4 に示すように 7 つの形質すべてに関連 (因子負荷の絶対値 > 0.4 が有意) し、全体の分散の 40% を説明する因子であるとされた。また、主要因子 2 は

体脂肪率、HDL コレステロール、トリグリセリドに関連し、全体の分散の 15% を説明する因子であるとされた。

次いで、これらの主要構成因子に関して全ゲノム解析が行われ、幾つかの連鎖を示唆する領域が得られたが、驚いたことに白人と黒人で示された連鎖領域は大きく異なっており、重複する領域は全く認められなかった (表 3)。このことはメタボリックシンドロームの成因に人種差が極めて大きく関係することを意味し、我が国におけるメタボリックシンドロームはやはり我が国の独自のデータに基づいて診断および解釈されるべきであることを示している。

3. ゲノムワイド連鎖解析のまとめ

現在までに、多数の疾患感受性遺伝子座位が報告されているが、中でも第 7 染色体長腕 7q21-31 や第 6 染色体長腕 6q22-26、および第 1 染色体長腕 1q21-31 の各領域は複数の研究で報告されており、これらの領域にメタボリックシンドロームの主要な疾患感受性遺伝子が存在する可能性が高い¹³⁾。特に、

表3 メタボリックシンドロームの主要構成因子を対象とした全ゲノム解析の結果 (HERITAGE Family Study) (文献¹²⁾より引用改変)

	染色体領域	短腕端からの距離 (cM)	構成因子	Multipoint P-value
白人	1q41	233	因子1	0.0097
	2p22	45~48	因子2	0.0045
	9q13	40	因子1	0.0095
	10p11	27~38	因子1	0.0003
	19q13	59	因子2	0.0009
黒人	1p34	54~56	因子2	0.0011
	7q31	134	因子2	0.0071
	9q21	60	因子2	0.0049

HERITAGE Family Study で黒人におけるメタボリックシンドロームの主要な原因遺伝子座が存在する可能性が示された第7染色体の長腕領域は、ヒスパニックを対象とした同様の研究においても強い連鎖を示し¹⁰⁾、大いに注目される。

おわりに

メタボリックシンドロームに関する因子分析の結果を中心として、メタボリックシンドロームの疾患感受性を規定する因子と幾つかの候補遺伝子、そしてゲノムワイド連鎖解析の結果に関して述べた。因子分析の結果に示されるように、メタボリックシンドロームはおそらくは複数の異なった病態を内包する概念であり、将来的にはおのおのの主たる成因に従った細分化が必要になるものと思われる。メタボリックシンドロームの遺伝的背景を明らかにすることはその端緒となり、またメタボリックシンドロームのより正確な診断と効果的な臨床介入に重要となろう。

文 献

1) Alberti K G, et al: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of dia-

betes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15 (7): 539-553, 1998.

- 2) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults: Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adults Treatment Panel III). *JAMA* 285 (19): 2486-2497, 2001.
- 3) Isomaa B, et al: Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 24 (4): 683-689, 2001.
- 4) Poulsen P, et al: Genetic versus environmental aetiology of the metabolic syndrome among male and female twins. *Diabetologia* 44 (5): 537-543, 2001.
- 5) Meigs J B: Invited commentary: insulin resistance syndrome? Syndrome X? Multiple metabolic syndrome? A syndrome at all? Factor analysis reveals patterns in the fabric of correlated metabolic risk factors. *Am J Epidemiol* 152 (10): 908-911, 2000.
- 6) Lawlor D A, et al: (Mis)use of factor analysis in the study of insulin resistance syndrome. *Am J Epidemiol* 159 (11): 1013-1018, 2004.
- 7) Reaven G M: Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37 (12): 1595-1607, 1988.
- 8) Abe H, et al: Hypertension, hypertriglyceri-

- demia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *J Clin Invest* 101 (8): 1784-1788, 1998.
- 9) Mori H, et al: The Pro12 → Ala substitution in PPAR- γ is associated with resistance to development of diabetes in the general population: possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 50 (4): 891-894, 2001.
- 10) Ohashi K, et al: Adiponectin I164T mutation is associated with the metabolic syndrome and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 43 (7): 1195-1200, 2004.
- 11) McQueen MB, et al: A QTL genome scan of the metabolic syndrome and its component traits. *BMC Genet* 4 (Suppl 1): S96, 2003.
- 12) Loos RJ, et al: Genome-wide linkage scan for the metabolic syndrome in the HERITAGE Family Study. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (12): 5935-5943, 2003.
- 13) 後藤田貴也: 代謝性疾患の遺伝子学. *最新医* 59 (増刊): 2049-2061, 2004.
- 14) Cheng LS, et al: Coincident linkage of fasting plasma insulin and blood pressure to chromosome 7q in hypertensive Hispanic families. *Circulation* 104 (11): 1255-1260, 2001.

Genetic Susceptibility to the Metabolic Syndrome

Takanari Gotoda

Clinical and Molecular Epidemiology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

【シグナル・パスウェイ】

メタボリックシンドロームの原因遺伝子

Genetic susceptibility to metabolic syndrome



後藤田貴也

Takanari Goroda

東京大学大学院医学系研究科臨床分子校学

◎メタボリックシンドローム(MetS)に含まれるそれぞれの異常はいずれも遺伝形質であり、MetS 自体も複数の遺伝因子を背景として過栄養と運動不足などの環境因子の負荷が加わり発症に至る複合遺伝形質である。因子分析の結果、MetS はたがいに独立した複数の病態を内包するが、その上流には主としてインスリン抵抗性と肥満を足場とした共通の因子が存在するものと考えられる。脂肪細胞の異常やインスリン抵抗性に関連する遺伝子は MetS の疾患感受性を規定する有力な候補遺伝子であり、実際に多数の候補遺伝子上の変異や多型と MetS に関連する表現型との間で有意な相関が報告されている。また、ゲノムワイド連鎖解析の結果により MetS の疾患感受性を規定するいくつかの染色体領域(第 1、第 6、第 7 染色体など)とその領域内にある候補遺伝子が明らかになりつつある。MetS の遺伝素因の解明はその正確な診断と効果的な臨床介入にとって重要となる。



内臓脂肪蓄積、インスリン抵抗性、因子分析、候補遺伝子、ゲノムワイド連鎖解析

メタボリックシンドローム(metabolic syndrome: 以下、MetS と略す)はそもそも、何らかの共通の成因的基盤のもとに複数の冠血管危険因子が重複し、高率に心血管疾患を引き起こす病態として提唱された¹⁾。最近では内臓脂肪蓄積を必須項目とし、そのほかに脂質代謝異常、血圧高値、空腹時血糖高値のうちの 2 項目以上を満たす場合と臨床的上は定義されている²⁾。近年、MetS という臨床概念があらたに提唱されるに至った背景には、糖尿病や高血圧、高コレステロール血症などの既存の単独の危険因子を管理対象とした場合に漏れてしまうハイリスク集団のスクリーニングの必要性があった。ところが、これまでの診断基準¹⁻³⁾に従った場合の MetS の心血管リスクの増大はせいぜい 3 倍程度⁴⁾と既存の単独の危険因子によるリスク増大とほぼ同程度に留まり、あらたなハイリスク群の予測因子として十分とはいえない。その原因として、MetS の成因がかならずしも明らかではないことに加えて、MetS が単一の病態

ではないことがあげられる。

本稿では遺伝的な側面から、MetS の成因と病態に関して考察を加えたい。

メタボリックシンドロームの遺伝因子の存在

MetS に含まれる主要な危険因子、すなわち内臓肥満や耐糖能異常(2 型糖尿病)、高脂血症や高血圧は、いずれも生活習慣病を代表する疾患である。このため、MetS も複数の遺伝因子の存在を背景として、そこに生活習慣などの環境因子の負荷が加わり発症に至る、いわゆる複合遺伝形質(complex trait)あるいは多因子遺伝性疾患(multifactorial disease)であると考えられている(図 1)。環境因子としては、動物性脂肪や単純糖質の摂取過多、食物繊維の摂取不足、運動不足やそれに伴う肥満、不規則な生活サイクルに起因する自律神経系のアンバランス、あるいは子宮内発育遅延などが指摘されている一方で、遺伝因子に関してはいまだ十分

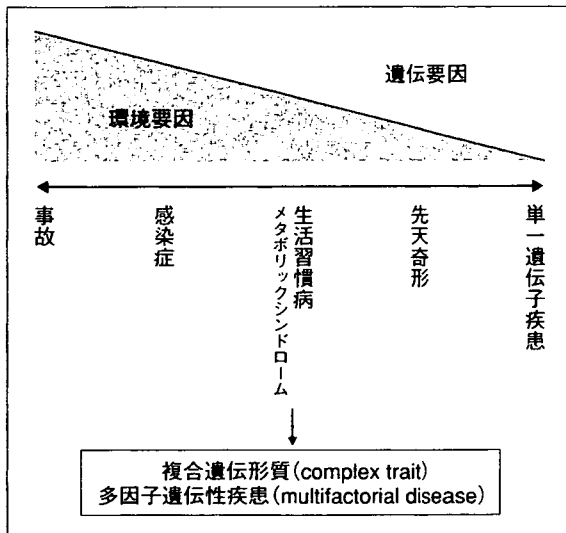


図1 複合遺伝形質としてのメタボリックシンドローム

に明らかではない(「サイドメモ」参照)。

双生児研究は疾患や表現型の遺伝度(heritability)を調べるもっとも基本的な方法であるが、MetSに関する双生児研究の結果によると、MetSに特徴的な糖、脂質、血圧、および体重の異常は、

サイド
メモ

HapMap project

複合遺伝形質の遺伝素因とは、多数の疾患感受性遺伝子上の遺伝子多型(その多くは単一塩基多型(SNP))の組合せにあるものと考えられている。成果の概要がつい最近報告された国際 HapMap project では、日本人を含む 269 人の DNA サンプルをもとに、それぞれ 100 万以上の SNP に関する遺伝子型が決定・比較されている²⁰⁾。SNP 間の連鎖不平衡解析とハプロタイプ地図作成を通じて各ハプロタイプを代表・特徴づける SNP(タグ SNP)とその最適組合せが選定・公表されたことにより、ゲノム全体では 1,000 万程度存在する SNP のうち、数十万程度のタグ SNP を調べることで、すべての SNP を調べるのに匹敵する情報が得られることになる。このことは、MetS などの common disease の疾患感受性遺伝子の同定に重要な、SNP を用いたゲノムワイドの相関解析を今後強力に推進する礎となることが期待される。HapMap project の成果は広く社会に還元されることを目的としており、Web(<http://www.hapmap.org>)で一般に公開されている。

いずれも高い遺伝度(0.52~0.80)をもつ遺伝形質であることが示されている⁵⁾。一方で、多因子性疾患としての観点から大規模な疫学調査の結果を因子分析(factor analysis)によって解析し、MetSの構成因子を調べた報告も数多くなされている。それらの結果はいずれも、MetSは、少なくとも3~4個以上の互いに独立した構成成分からなることが示されている⁶⁾(表1)。約2,000名の日本人を対象として著者らが行った因子分析の結果でも、①インスリン抵抗性と肥満に関連した因子、②血圧に関連した因子、③糖代謝異常に関連した因子、④脂質代謝異常と肥満に関連した因子、の計4つの因子によって、MetSにみられる変動の70%以上が説明可能であった。つまりMetSは単一の病態ではなく、それぞれに高い遺伝度を有する、少なくとも3~4個以上の独立した病態を内包するものと考えられる。

因子分析からみた危険因子の重複機序

因子分析の結果ではインスリンが、糖や脂質、肥満といった複数の因子と同時に抽出される(表1)ことから、インスリン抵抗性が危険因子重複の背景に存在することが示唆されている。一方、各因子のなかで血圧関連因子が単独で抽出される場合が多いことより、MetSのなかにあつて血圧の異常は他の異常とは成因上やや異なった位置づけにあるとの主張もなされている⁷⁾。

欧米人に比べて遺伝的にインスリン分泌予備能が小さい日本人ではインスリン抵抗性の関与が軽視されがちであるが、著者らの因子分析の結果においても空腹時のインスリン高値がMetSの主要構成因子の根幹をなすことが示されている。すなわち、著明な高インスリン血症をみることはまれであってもインスリン抵抗性が日本人における危険因子重複の背景に存在することは疑いないものと思われる。

ところで、MetSの成因を探る目的で因子分析が多用される一方、MetSに含まれる各構成因子や変数間に階層構造を仮定し、それを検証する目的で因子分析(confirmatory factor analysis)を用いた解析結果も報告されている⁸⁾。それによると、4つの主要な構成因子(インスリン抵抗性、肥満、脂質異

表 1 因子分析によるメタボリックシンドロームの構成因子の抽出

Kaiser Permanente Women Twin Study	Framingham Offspring Study	Strong Heart Study of American Indians	Honolulu Heart Program of Japanese American	Japanese American Community Diabetes Study	日本人健診受診者
体重*	BMI*	BMI**	体重*	中性脂肪##	インスリン**
脂肪分布	W/H 比	グルコース	胴囲	HDL-C	BMI
グルコース**	インスリン	インスリン	インスリン	LDL 粒子径	血圧#
インスリン	中性脂肪	血圧#	グルコース**	胴囲**	グルコース**
血圧#	HDL-C	インスリン##	インスリン	グルコース	中性脂肪##
中性脂肪##	グルコース**	中性脂肪	血圧#	インスリン	HDL-C
HDL-C	インスリン	HDL-C	中性脂肪##	CRP	BMI
	BMI#		HDL-C	血圧#	
	血圧				

*：肥満関連因子，**：糖代謝関連因子，#：高血圧関連因子，##：脂質代謝関連因子。

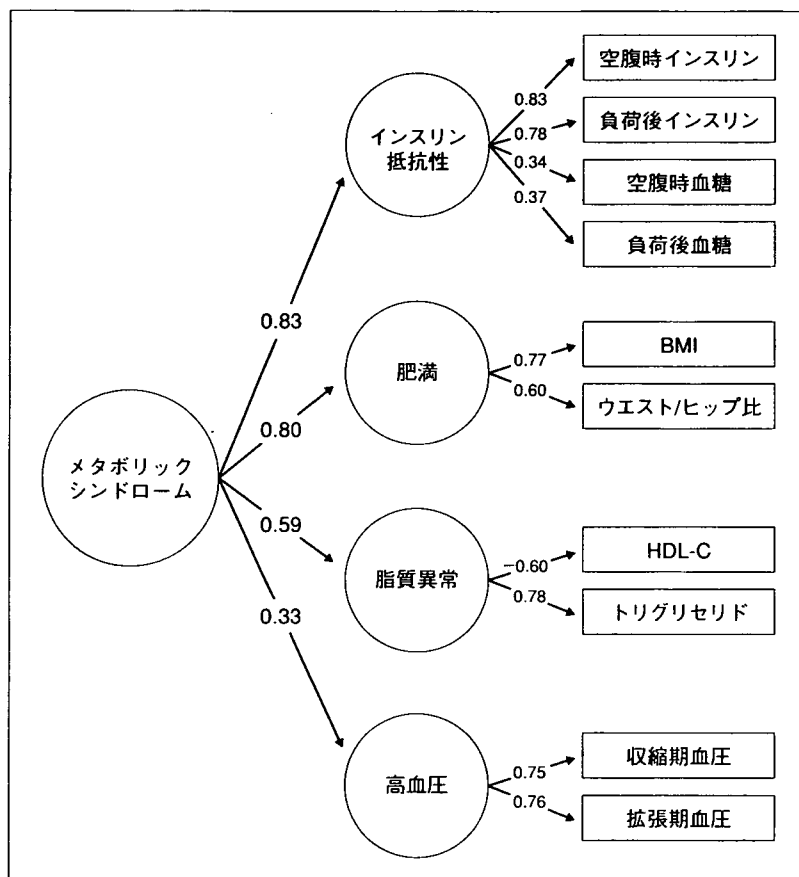


図 2 メタボリックシンドローム構成因子の階層構造

図中の数値は各因子間の相関を示す係数(因子負荷値)を示し、絶対値が1に近いほど、関連が強い。

常、高血圧)の最上層に、それぞれとの相関を示す係数(因子負荷値)が 0.83, 0.80, 0.59, 0.33 となるような単一の因子の存在を仮定した階層構造モデ

ル(図 2)が構築されるという。

以上、因子分析の結果をまとめると、MetS は互いに独立した複数の病態を内包するが、主として

表 2 メタボリックシンドロームの候補遺伝子

遺伝子名	染色体上の局在	多型/変異	関連する表現型
ADRB2(B2 アドレナリン受容体)	5q32-q34	G16R	MS(男性で)
ADRB3(B3 アドレナリン受容体)	8p12-p11	W64R	Ob, IR
APM1(アディポネクチン)	3q27	I164T, SNP	IR, Ob and MS
APOC3(アポ蛋白 C3)	11q23	455T-C	TG, Ob and MS
APOC3/A4/A5(アポ蛋白 C3/A4/A5)	11q23	SNP	Ob, HT, IR, TG
AGT(アンジオテンシノーゲン)	1q42-q43	T174 M	HT and MS
CAPN10(カルパイン 10)	2q37	SNP-43	BS, TG(肥満者で)
FABP2(脂肪酸結合蛋白 2)	4q28-q31	A54T	TG and MS
GCCR(グレリン受容体)	3q26	SNP	Ob and MS
GHSR(グルココルチコイド受容体)	5q31	RFLP, N363S	Ob, HT, IR
GNB3(G 蛋白質 $\beta 3$ -サブユニット)	12p13	C825T	HT and MS
IL6(インターロイキン 6)	7p21	SNP(プロモーター)	IR, TG, Ob and MS
INPPL1(SHIP2)	11q23	SNP	HT and MS
INS(インスリン)	11p15	RFLP	TG and MS
LEP(レプチン)	7q31	SNP, VNTR	Ob, HT
LMNA(ラミン A/C)	1q21	H566H	TG, HDL and MS
LPL(リポ蛋白リパーゼ)	8p22	SNP	IR, TG and MS
LTA(リンフォトキシン α)	6p21	T60N	BS and MS
NOS3(内皮依存性 NO 合成酵素)	7q36	7164G-T, D298D, etc.	HT and MS
PPARG(PPAR- γ)	3p25	P12A	TG, HT, IR and MS
PPARGC1A(PGC-1 α)	5q32	G482S	HT, HDL-C and MS
PPARD(PPAR- δ)	6p21	+294T/C	Ob, TG and MS
PTPN1(蛋白チロシン脱リン酸化酵素 1B)	20q13	SNP	TG, HDL, Ob, BS & HT
UBL5(BEACON)	19p13	SNP	BS, TG, Ob
UCP1(脱共役蛋白 1)	4q31	SNP	Ob, IR
USF1(上流刺激因子 1)	1q22-q23	SNP	TG and MS

SNP：単一塩基多型，RFLP：制限酵素切断断片長多型，TG：高トリグリセリド血症，HDL：低 HDL コレステロール血症，MS：その他のメタボリックシンドロームの表現型，BS：糖代謝異常，HT：高血圧，IR：インスリン抵抗性，Ob：肥満。

インスリン抵抗性と肥満を足場とした単一因子がそれらの上流に存在して病態全体(危険因子の重複)を説明すると仮定しても矛盾を生じない、という結論になる。

メタボリックシンドロームの候補遺伝子

Reaven 以来、MetS の成因的基盤をなすものとして“インスリン抵抗性の亢進”が注目されている⁹⁾。実際に、インスリンシグナル伝達機構の一分子を欠損するマウスでは、骨格筋を中心としたインスリン抵抗性の亢進に加え、MetS に特徴的な脂質代謝異常と高血圧を呈することが報告されている¹⁰⁾。また、脂肪細胞はインスリン感受性や糖・脂質代謝、血圧の調節にあずかるさまざまな生理活性物質(アディポサイトカイン)を産生しており、脂肪細胞自体の異常もインスリン抵抗性や MetS の発現を規定・修飾する因子であることが示されている。このような MetS の原因となりう

る標的因子に関連する遺伝子は、MetS の疾患感受性を規定する有力な候補遺伝子である。実際に、多数の候補遺伝子上の変異や多型と MetS に関連する表現型との間で広く相関解析(association study)が行われ、複数の表現型との間に有意な相関がみられる遺伝子が多数報告されている(表 2)。これらのなかで、PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ)遺伝子の Pro12Ala 多型における Pro アリルは 2 型糖尿病の発症リスクを 25%程度増加するとされ、これは日本人においても確認されている^{11,12)}。また、アディポネクチン遺伝子の Ile164Thr 変異が日本人において低アディポネクチン血症と糖尿病に関連し、Mets および冠動脈疾患とも関連することが報告されている¹³⁾。