

molecular basis was not identified¹⁴⁻¹⁶. More recently, it was reported that patients with ATGL mutation had severe heart disease^{17, 18}, but without mention of TG deposition in coronary arteries.

Possible implications for research and clinical medicine:

1. Elucidation of pathophysiology of TGCV
2. Investigation of the initiation and progression of atherosclerosis in TGCV, particularly focusing on the difference between atherosclerosis in TGCV and classical atherosclerosis, described by Ross *et al.*^{19, 20}.
3. Determination of the relevance of TGCV phenotype. For this purpose, a population with a high prevalence of TGCV needs to be found.
4. Identification of primary and secondary causes of TGCV
5. Development of laboratory test or other method for easy evaluation of tissue TG accumulation.
6. Examination of the relationship between TG deposition in the heart and acute coronary syndrome.

Medical science has seen novel hypotheses put forward and breakthroughs achieved, such as those for FH²⁾ and Tangier disease²¹⁾, as a result of patient-oriented research²²⁾. "Cholesterol and atherosclerosis" seem to be close to the goal, whereas "Inflammation and atherosclerosis" are the subject of heated discussion²³⁾. This single reported case may indicate that this is a suitable time to ask whether "TG" comes back from adipose tissue to the heart.

Acknowledgements

The author would like to thank Drs Yoshihiko Ikeda, Hatsue Ishibashi-Ueda, Seiichiro Tarui, Hitonobu Tomoike and Masatsugu Hori for their helpful comments and discussions. The author would like to thank Mr. Jan K. Visscher for proofreading the manuscript.

References

- 1) Kannel WB, Dawber TR, Friedman GD, Glennon WE, McNamara PM: Risk factors in coronary heart disease. An evaluation of several serum lipids as predictors of coronary heart disease; The Framingham study. *Ann Intern Med*, 1964; 61: 888-899
- 2) Brown MS, Goldstein JL: Familial hypercholesterolemia: A genetic defect in the low density lipoprotein receptor. *N Engl J Med*, 1976; 294: 1386-1390
- 3) Endo A, Kuroda M, Tanzawa K: Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett*, 1976; 72: 323-326
- 4) Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto Jr. AM, Kastelein JJP, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ for the JUPITER study group: Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*, 2008; 359: 2195-2207
- 5) Ramasubbu K, Estep J, White DL, Deswal A, Mann DL: Experimental and clinical basis for the use of statins in patients with ischemic and nonischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 2008; 51: 415-426
- 6) Mazzone T, Chait A, Plutzky J: Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. *Lancet*, 2008; 371: 1800-1809
- 7) Asian Pacific Cohort Studies Collaboration: Serum triglycerides as a risk factor for cardiovascular disease in the Asia-Pacific Region. *Circulation*, 2004; 110: 2678-2686
- 8) Bottcher CJF, Boelsma-van Houte E, Ter Haar Romeny-Wachter CCh, Woodford FP, van Gent CM: Lipid and fatty-acid composition of coronary and cerebral arteries at different stages of atherosclerosis. *Lancet*, 1960; i: 1162-1167
- 9) Mendez J, Tejada C: Relation of severity of atherosclerosis to chemical composition of human aorta. *Am J Clin Pathol*, 1969; 51: 113-118
- 10) Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, Lass A: Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res*, 2009; 50: 3-21
- 11) Bing RJ, Siegel A, Ungar I, Gilbert M: Metabolism of the human heart. II. Studies on fat, ketone, and amino acid metabolism. *Am J Med*, 1954; 16: 504-515
- 12) Hirano K, Ikeda Y, Zaima N, Sakata Y, Matsumiya G: Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy. *N Engl J Med*, 2008; 359: 2396-2398
- 13) Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, Heldmaier G, Maier R, Theussl C, Eder S, Kratky D, Wagner EF, Klingenspor M, Hoefler G, Zechner R: Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science*, 2006; 312: 734-737
- 14) Hasebe M: A case of Jordans' anomaly. *Rinsho Ketsueki*, 1983; 24: 553-558 (in Japanese)
- 15) Ibayashi H, Ideguchi M, Harada N, Ishimoto S, Goto I: Systemic triglyceride storage disease with normal carnitine: a putative defect in long chain fatty acid metabolism. *J Neurol Sci*, 1988; 85: 149-159
- 16) Oshima Y, Hirota H, Nagai H, Izumi M, Nakaoka Y, Osugi T, Fujio Y, Tateyama H, Kikui M, Yamauchi-Takahara K, Kawase I: Specific cardiomyopathy caused by multisystemic lipid storage in Jordan's anomaly. *Circulation*, 2002; 106: 280-281
- 17) Kobayashi K, Inoguchi T, Maeda Y, Nakashima N, Kuwano A, Eto E, Ueno N, Sasaki S, Sawada F, Fujii M, Matoba Y, Sumiyoshi S, Kawate H, Takayanagi R: The lack of the C-terminal domain of adipose triglyceride lipase causes neutral lipid storage disease through impaired interaction with lipid droplets. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008; 93: 2877-2884
- 18) Akiyama M, Sakai K, Ogawa M, McMillan JR, Sawamura D, Shimizu H: Novel duplication mutation in the patatin

- domain of adipose triglyceride lipase (PNPLA2) in neutral lipid storage disease with severe myopathy. *Muscle Nerve*, 2007; 36: 856-859
- 19) Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N Engl J Med*, 1986; 314: 488-500
 - 20) Ross R: Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999; 340: 115-126
 - 21) Goldstein JL, Brown MS: The clinical investigator: Bewitched, Bothered, and Bewildered - But still beloved. *J Clin Invest*, 1997; 99: 2803-2812
 - 22) Fredrickson DS: The inheritance of high density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *J Clin Invest*, 1964; 43: 228-236
 - 23) Hansson GK: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 2005; 352: 1685-1695

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

中性脂肪蓄積心筋血管症 4 例の形態学的特徴に関する研究

研究分担者 植田 初江 国立循環器病研究センター 臨床病理科 医長
研究協力者 池田 善彦 国立循環器病研究センター 臨床病理科 医員

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症の剖検心及び摘出心各 2 例を用いて病理組織学的検討を行った。全例においてこれまで不整脈源性右室心筋症に特徴的とされている線維脂肪化を伴う心筋細胞の脱落を認めた。残存心筋細胞、血管を含む間質の細胞には細胞質内に triglycerides と思われる microvesicular lipid を認めた。また、心筋細胞は部分的に肥大型心筋症に特徴的とされる 錯綜配列を呈していた。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy, TGCV) は adipose triglyceride lipase (ATGL) 遺伝子変異を原因の一つとする心疾患と考えられる。今回、TGCV 4 例の形態学的特徴を明らかにする。

B. 研究方法

Jordans 異常例及び ATGL 変異例の剖検心 2 例と ATGL 変異例の心臓移植時の摘出心 2 例について、それらの心筋組織を 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定後、パラフィン切片標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色、マッソントリクローム染色、抗 ATGL 抗体を用いた免疫染色を施行して評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は病理組織学的解析であり、遺伝子解析は施行していない。摘出心については研究実施前に実施計画に関して大阪大学の倫理委員会から文書による承認を得ている。また、剖検症例についての研究協力の同意は、遺族の自由意思で決めていただいた、臓器の一部の医学研究目的使用について承諾され、すでに署名をいただいている剖検承諾書をもって同意とすることについて当センター倫理委員会から文書による承認を得ている。

C. 研究結果

全例において不整脈源性右室心筋症 (arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, ARVC) にこれまで特徴的と報告されてきた線維脂肪化を伴う心筋細胞の脱落を認めた。残存心筋細胞、血管を含む間質の細胞 (平滑筋細胞、内皮細胞、線維細胞)、血管内の好中球及び単球には細胞質内に triglycerides と思われる空胞化を認めた。また、心筋細胞は部分的に肥大型心筋症 (hypertrophic cardiomyopathy, HCM) に特徴的とされる錯綜配列を呈していた。心内膜を被覆する内皮細胞の細胞質にも空胞化を認め、1 例においては器質化過程の壁在血栓を伴っていた。免疫染色の結果、全例において心筋細胞及び間質の全ての細胞が ATGL 陰性であった。

D. 考察

TGCV 4 例の病理組織学的検討を行った。これらは ARVC や HCM に特徴的な組織像を呈していたことから、原発性心筋症との鑑別を要すると考えられた。また、今回検討した 4 例は肉眼的に拡張型心筋症 (dilated cardiomyopathy, DCM) の形態にも類似しており、TGCV は DCM、拡張相 HCM、左室を包含する ARVC の鑑別疾患として挙げられると考えられた。

E. 結論

中性脂肪蓄積心筋血管症の形態学的特徴は部分的に ARVC や HCM と類似する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

XXth. World Congress International Society of Heart Research (Kyoto, 13-16, May, 2010)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

病理組織検体を用いた中性脂肪蓄積心筋血管症の検索

研究分担者 加藤 誠也 琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座 教授

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症（Tryglyceride Deposit cardiovascularopathy;TGCV）は心筋、冠状動脈への過剰な中性脂肪の蓄積を特徴とする疾患であり、本疾患の罹患率の把握と診断法の確立のためには病理組織検体を用いた検索が有用と考えられる。本研究では、剖検心および心筋生検組織を用いて、HE染色等の標準的な染色法に加えて脂肪染色、免疫組織染色法、電子顕微鏡検査（電顕）を用いた検索を行った。脂肪染色にはパラフィン未包埋組織が必要であるが、凍結切片によるOil-red O染色、Nile blue染色やオスミウム前固定法のいずれも組織内脂質沈着の検出に有用であった。TGCVでは、adipose triglyceride lipase(ATGL)の遺伝子異常による酵素発現の欠損が指摘されており、抗ATGL抗体を用いた免疫組織染色も脂質沈着症例におけるATGL遺伝子異常の有無を評価するのに有用と考えられた。しかしながら、染色結果が検体の状態、特に固定条件に左右されやすく、また抗原賦活化法など染色手技にも工夫が必要であり、簡便に、かつ高い精度で多くの症例を検索するためには更に検討が必要と考えられた。電顕では、細胞内の微細な脂肪滴の評価が可能であり、脂肪染色や免疫染色の欠点を補完しうる有用な検索法と言える。今回、剖検心、心筋生検合計100例の組織学的検索を行ったが、確定的なTGCVは発見されず、ATGL遺伝子異常により顕著な脂質沈着を来す原発性TGCVの罹患率の把握には更に多数の症例の検索が必要と考えられた。また、今回、糖尿病合併の高齢者の1剖検例に脂質の過剰沈着を認め、なんらかの基礎疾患を背景に脂質代謝異常を来し、2次的にTGCV類似の病態を来している症例の存在も示唆された。このようないわゆる2次性TGCVの病因病態についても更に症例を蓄積した検討が望まれる。

A. 研究目的

本研究の目的は、中性脂肪心筋血管症（TGCV）の罹患率を明らかにし、また診断法を明確するために必要な病理組織学的な検索方法を確立する事である。日常的な病理組織学的検査で得られる心臓血管由来

の病理組織は少ないが、心筋症、心筋炎の診断時にしばしば採取される心内膜下心筋生検組織や剖検症例の心筋、冠状脈組織を対象として、病理組織学的検索方法を確立し、同時にTGCVに相当する病態の発掘を目指すものである。

B. 研究方法

病理検体（剖検、心筋生検）を用い、心筋血管組織で各種の脂肪染色を用い、脂質沈着の評価を行った。また、中性脂肪心筋血管症の原因遺伝子adipose triglyceride lipase (ATGL)の組織内発現について免疫組織学的検討を行った。同時に電顕による検索を追加した。ATGL発現様式については、通常のHE染色等による組織変性度との相関についての検討を試みた。

（倫理面への配慮）

本研究は、通常の病理学的検索が完了し当該施設に保管中の検体を用いた後ろ向き観察研究であり、本研究実施のために検体の由来する被験者に新たな侵襲や不利益を被る事はない。検体は、研究目的の使用に関する包括的同意を得たものを用い、その他、経年を経て同意を得ることが困難である場合を含め、研究の遂行にあたっては、「ヘルシンキ宣言」、「臨床研究に関する倫理指針（厚生労働省）」を遵守し、組織の提供者である個人の人権擁護を行う。

C. 研究結果

（1）脂肪染色

一般的な病理学的検査では、ホルマリン固定後パラフィン切片が用いられる。この方法は、組織形態の保持や固定後の検体の長期保管にきわめて有用であるが、標本作製の工程でキシレン等の有機溶剤処理によりパラフィンを除去する必要がある、この際に組織内の脂質も遊出し失われてしまう。今回、まずホルマリン漬剖検心50

例よりオスミウム前固定により脂質を保護した上、パラフィン切片を作製し鏡検した。この方法は、凍結切片を用いる脂肪染色に比し、組織形態の保持に優れ、また脂肪染色可能な標本の長期保存も可能である。しかしながら、オスミウム廃液処理を含め他の脂肪染色法に比し手技がやや煩雑である事が欠点と考えられる。ついで同じホルマリン漬組織を20%ショ糖加緩衝液で置換した上でOCTコンパウンドに包埋し凍結切片を作成した。当初は主としてOil-red O染色を施行したが、プロパノール処理を必要としないNile blue染色の方が脂肪組織からの脂肪漏出によるartifactが少なく観察が容易である事が判り、以後の検索にはNile blue染色を用いた。この方法は、中性脂質は赤色、コレステロールは淡赤色、リン脂質は青色に識別可能とされるが、長期間ホルマリン中で維持された検体の場合は、染色性や分別性が低下し、脂質の種類を評価する事は必ずしも容易ではないと判断された。またNile blue染色は短期間に脱色するため、染色後の状態を保ち、後日、再評価する事は出来ないため注意が必要である。

（2）免疫組織染色

市販の抗ATGL抗体を用いて心臓血管組織におけるATGLの発現様式を検討した。なお今回の検索ではホルマリン固定時間の長い剖検組織はさけ、心筋生検組織を主に使用した。染色に先立ってクエン酸緩衝液(pH6)中でオートクレーブないしマイクロウェーブによる抗原賦活が必要であったが、backgroundの染色性が低い後者を選択した。通常の内因性ペルオキシターゼ、非

特異的蛋白の吸着後、1次抗体は、1:200を至適濃度とし、4℃で一晩、あるいはマイクロウェーブ法（37℃、20分間）でincubateし、DAKO社のEnVision法を用い、AEC発色にて検出した。50例の心筋生検組織の84%がATGL陽性であった。陰性例について電顕標本を再評価し、少量の脂肪滴沈着を示す症例もあったが、少なくとも平野らの報告したTGCV確定例に相当する顕著な脂質沈着を示す症例は見出す事ができなかった。

（3）電子顕微鏡的観察

電顕は、細胞内の微細な脂肪滴の評価が可能であり、通常の脂肪染色や免疫染色の欠点を補完しうる有用な検索法と言える。また電子顕微鏡検査では、電子線を透過させるための超薄切片の作成に先立ち、トルイジンブルー染色によるthick sectionの光学顕微鏡下での観察を行い、適切なエポン包埋組織のトリミングの上で標本を作成する。この際、脂質沈着の高度な部位は、トルイジンブルー染色標本でも検出可能であり、あわせて本症の検索に有用と判断される。

（4）症例の検索

剖検心については50症例より心筋、冠動脈組織を検索した。高齢者の糖尿病合併の1例で心筋に脂肪滴沈着増加が見出されたが、電顕での脂質沈着はTGCV確定例に比し軽度であり、ATGL遺伝子異常による原発性TGCVとは異なる様式の脂質沈着と思われた。剖検例については、心臓疾患の有無に係わらず症例を検索しており、今後は各種病態における代謝異常と脂質の沈着につ

いても考慮すべきと思われる。次に冠動脈組織については、原発性TGCVに特徴的とされる中膜も含めた血管壁全層の脂質沈着を示す症例は見出されなかった。心筋生検50症例の標本においては、上記（2）に記載したように2割弱の症例でATGL染色陰性であったが、これらも電顕による再評価も含め原発性TGCV確定例ほど顕著な脂質沈着を示す症例はないと判断された。心筋生検における組織学的変性度と心機能との相関については必ずしも一定した見解はないが、今回、ATGLの免疫染色が陽性であった症例について、ATGL染色強度と組織変性度の指標として、心筋肥大、核の変性度、空胞変性、線維化、筋原線維の粗鬆化、間質の脂肪浸潤の各項目との相関についての検討を行った。これらの組織学的変性度の指標とATGL染色強度との間に相関関係は明らかではなかったが、この点は、更に免疫染色工程の改善も必要である点も含め引き続き症例を追加して検討したい。

D. 考察

通常ホルマリン固定パラフィン切片は工程上の脂質遊出のため本症の検索には不適であり、脂肪染色の手法としてはオスミウム固定による脂質保護や凍結切片によるNile blue染色が有用であったが、通常的心血管病理の検体では凍結切片を確保する事は稀であり、病理組織検体を用いたスクリーニングへの応用における脂肪染色の利用については、このような手技の煩雑さや脂質の種類を分別し得ない点が課題として残る。生検組織ではATGLの免疫染色が可能であり、多くの病理検体がホルマリン固定パラフィン切片として保管

、されている現状にかんがみても特に有用な症例の検索方法と言える。しかしながら、現時点の手技では一定数の偽陰性症例があり、より有用な抗体の開発も含め、技術の向上が必要であろう。なお細胞内脂質沈着の確認には電顕の信頼性が高く、一般的な心筋生検でもしばしば電顕が併用されるため、本症を念頭においた電顕写真の評価を啓蒙する事もまた有意義と考えられる。今回、検索した合計100症例の中には確定的なTGCV症例はなく、あるいは原発性TGCVは罹患率もしくは浸透率の低い疾患である可能性も否めないが、一方、たとえば糖尿病など一部の疾患では2次的に本症類似の病態を生じている可能性がある。実際にインスリン抵抗性とATGLの機能低下との関連も指摘されており、病理学的にも顕著な脂質沈着を来す原発性TGCVに限らず、種々の程度の細胞内中性脂肪沈着が細胞機能の異常を介して病態を形成する、いわゆる2次性TGCVについても今後、その実態について明らかにする必要がある。

E. 結論

既存の病理組織検体を用いた検索は、後ろ向きの研究手法ながら中性脂肪心筋血管症TGCVの罹患率を知る上でも有用であり、引き続き本症ならびに類似した病態を示す症例の発掘と解析を進める必要がある。このためには、より簡便で精度が高く、多くの一般的な病理検査室においても普及可能な手法による本症の病理組織学的検索について、引き続き従来の手法の改良、改善に努める必要がある。また、心筋、血管への顕著な脂質沈着を示す原発性のATGL欠損症以外にも本症類似の病態を示

す症例の存在が推定されるため、現時点では臨床症状の有無にとらわれず広く症例を検索する事が望まれる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

中性脂肪蓄積心筋血管症症例における adipose triglyceride lipase (ATGL) 遺伝子異常の
発見とその局在・機能変化におよぼす影響に関する研究

研究分担者 小林邦久 九州大学病院 内分泌代謝・糖尿病内科・助教

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症症例における ATGL 遺伝子異常が ATGL の細胞内局在および機能の変化におよぼす影響について検討した。症例の組織において脂肪滴を認め、細胞脱落・線維化をきたしており、それにともなって臓器機能低下を認めた。症例の ATGL は、4 塩基欠損でフレームシフト・早期終止コドンが生じ、疎水性領域を含む C 末端側の欠損と、偶然に生成した核移行シグナルを含むナンセンス配列を生じていた。その結果、ATGL の脂肪滴への局在が阻害され、脂肪滴が蓄積することによって本病態が生じていることが明らかとなった。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症症例の病理学的精査および糖・脂質代謝の検討をおこなう。さらに症例における ATGL 遺伝子異常の同定と、その変異が ATGL の細胞内局在および機能の変化におよぼす影響について検討する。

B. 研究方法

当科において経過観察されていた中性脂肪蓄積心筋血管症の兄妹例において、糖・脂質代謝および各種臓器機能を検討した。また、皮膚生検サンプルから線維芽細胞を樹立した。さらに末梢白血球から cDNA を作製し、遺伝子配列決定・発現実験をおこなった。

(倫理面の配慮)

本研究は、当科外来の中性脂肪蓄積心筋

血管症患者のインフォームド・コンセントおよび九州大学大学院医学研究院ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査専門委員会の認可をうけて行なった。

C. 研究結果

不整脈にて死亡した兄の各剖検組織において脂肪滴を認め、細胞脱落・線維化をきたしていた。生存例（妹）において、脂肪肝・ミオパシー・心不全・慢性膵炎・甲状腺機能低下症・アディポカイン（レプチン・アディポネクチン）低下を認めたが、トリグリセリドを含めた血清脂質は正常であった。インスリン分泌能低下を伴う糖尿病を認めたが、人工膵臓で評価したインスリン抵抗性は正常であった。症例の ATGL cDNA の遺伝子配列において、799-802 番目の部位の 4 塩基欠損によるフレームシフ

トで C 末端側の疎水性領域が欠損していた。症例の ATGL 遺伝子を GFP 融合発現ベクターに組み込んで症例細胞に遺伝子導入を行ったところ、正常 ATGL が脂肪滴周囲に局在しているのに対して、主に核に局在していることがあきらかになった。すなわち症例において ATGL は、疎水性領域がないことで脂肪滴周囲に分布できないだけでなく、核に局在してしまうことによって細胞質の脂肪滴を分解できない可能性が考えられた。疎水性領域が症例と同様に全部欠損している欠損変異体は核への局在を認めなかったことから、4 塩基欠損で生じたフレームシフト部分が、症例 ATGL の核への局在に関与していることが予想された。フレームシフト部分のアミノ酸配列を核移行シグナルデータベースで検索したところ、既報の核移行シグナル R[G or A][I,V,L or P]KRR と類似した部分があり、候補と考えられた。この配列に変異を導入したものを GFP 融合発現ベクターに組み込んで症例細胞に遺伝子導入を行った。変異を導入した ATGL は核に局在せず、細胞質に一様に分布した。しかし、脂肪滴は残存しており細胞内中性脂肪含有量も対照との間に有意差を認めなかった。

D. 考察

上記の実験結果によって ATGL の C 末端側の疎水性領域は ATGL が脂肪滴周囲へ局在するために必須であり、その欠損により、中性脂肪が心筋や動脈壁・骨格筋などの非脂肪組織・細胞に蓄積することが中性脂肪蓄積心筋血管症における各種臓器障害をきたす原因であると考えられた。また、本変異症例においては 4 塩基欠損によるフレー

ムシフト部分に偶然生じた核移行シグナルにより変異 ATGL が核に局在することが、さらに細胞障害を増悪させている可能性もあり、現在検討中である。症例においては、脂肪肝・脂肪筋・低アディポネクチン血症を認めるのにもかかわらず、インスリン抵抗性は正常であり、ATGL ノックアウトマウスのインスリン感受性が亢進している点を考え合わせると、きわめて興味深い特徴と考えられる。現在、ATGL を siRNA でノックダウンさせて各種細胞代謝における変化を検討中である。

E. 結論

当科の中性脂肪蓄積心筋血管症における ATGL 変異は疎水性領域欠損のみならず、蛋白の核局在を惹起することにより全身の細胞への中性脂肪蓄積を引き起こしていることが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

ミオパシーを合併する全身性中性脂肪蓄積症 (neutral lipid storage disease with myopathy: NLSDM) の 1 例

小林邦久, 井口登與志, 前田泰孝, 中島直樹, 高柳 涼一

Diabetes Journal 37(2): 52-56, 2009

2. 学会発表

全身性中性脂肪蓄積症における ATGL 遺伝子の構造および細胞内局在の変化と機能との関係

小林邦久, 井口登與志, 前田泰孝, 佐藤美

紀子, 横溝 久, 平田英一, 井手千晴, 鄭
静, Hari Hendarto, 鴨井佐和, 池田紀子,
武井涼子, 藤井雅一, 的場ゆか, 中島直樹,
高柳涼一

第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会 (大
阪 : 2009.5.21-24)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含
む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

中性脂肪蓄積心筋血管症（TGCV）に関する研究

研究分担者 笹栗 靖之 産業医科大学第二病理学 教授

研究要旨

病理解剖例における TGCV 症例の検索。
100 症例の中性脂肪染色の試み。

A. 研究目的

病理解剖においては、病因・死因が必ずしも明らかになっていない症例が多数含まれている。今回我々は、臨床情報等を照らし合わせて、TGCV が背景に潜在していた可能性のある解剖症例を網羅的に検索・検討した。

B. 研究方法

産業医科大学および九州厚生年金病院における、2003～2009 年までの病理解剖症例 480 例の中から、高血圧・心筋症・糖尿病・透析・アミロイドーシスといった臨床背景を有する 100 症例に限定して、検討を行った。

ホルマリン固定された心臓・大動脈・骨格筋を再切り出しし、ヘマトキシリン・エオジン染色（H&E）による組織学的再検索を施行した上で、中性脂肪染色（HCS LipidTOX Phospholipidosis and Steatosis Detection Kits, Invitrogen）を全症例の各臓器において網羅的に行った。中性脂肪沈着の程度（0～3+）と臨床背景との関連性を検討し、潜在的な TGCV 症例の可能性を探った。

（倫理面への配慮）

我々病理医は死体損壊罪（刑法 190 条）を熟知・遵守しており、さらに、社団法人日本病理学会倫理委員会において、病理解剖に関わる倫理的課題とその対応を検討し、遺族の承諾・説明等を含めて遂行している。

C. 研究結果

特に心筋において、中性脂肪の沈着が有意に認められ、リポフスチン色素沈着部位と部分的に一致していた。一方、大動脈中膜と骨格筋においては中性脂肪の蓄積は同定されなかった。これら中性脂肪沈着の程度は、高齢者で有意に高い傾向が認められた。さらに、背景疾患としては、症例数は少ない（n=5）ながらも、心筋症において有意に強い沈着が見られた。

D. 考察

多くの解剖症例の中から典型的な TGCV 症例を検索するのは困難であったが、潜在的 TGCV（pre-TGCV）に相当するような数症例が指摘し得た。と同時に、pre-TGCV の疾患概念の可能性が示唆された。

さらに心筋に対する中性脂肪染色を試み、

症例数を蓄積させ今後検討していきたい。
また脂質解析を施行して、染色結果との整合性も併せて検討して行かねばならない。

E. 結論

中性脂肪染色による、解剖症例臓器の網羅的な検索により、心筋特異的な中性脂肪蓄積症の潜在する可能性が示唆された。現在の限定された診断基準を超えて、広汎な疾患概念として TGCV を再度捉え直さねばならない可能性もある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

日本病理学会に報告予定。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特になし。

TGCV の生化学的スクリーニング

研究分担者 財満 信宏 浜松医科大学 特任助教

研究要旨

原発性中性脂肪蓄積心筋血管症（TGCV）以外の心筋及び冠動脈の脂質を解析し、TGCV 様のフェノタイプを示す疾患群を探索した。その結果、2 型糖尿病患者群において、TGCV 様の脂質代謝異常があることを見出した。

A. 研究目的

TGCV は平野班長らが発見した新規の疾患単位であり、心筋と冠動脈における中性脂肪の異常蓄積を特徴とする。原発性 TGCV は Adipose Triglyceride lipase (ATGL) の変異で引き起こされる疾患であるが、中性脂肪の代謝は ATGL の経路以外でも制御されており、他経路の障害によって心筋及び冠動脈において中性脂肪代謝異常が引き起こされている可能性が考えられる。本研究は、原発性 TGCV 以外に TGCV 様のフェノタイプを示す疾患群が存在するかどうかを検証した。

B. 研究方法

剖検により採取された心筋及び冠動脈をホモジナイズし、Bligh & Dyer 法によって総脂質を抽出した。溶媒を蒸発させたのち、界面活性剤を抽出脂質に一定の割合に混ぜ、比色法によって組織中の中性脂肪、コレステロール、リン脂質量を定量した。実験は浜松医科大学の倫理委員会の承認を得て行った。

（倫理面への配慮）

本研究は倫理委員会の承認を受けた後、被験者に対してインフォームドコンセントを実施し書面にて同意を得た。

C. 研究結果

2 型糖尿病患者群では 10 例中 6 例に心筋における中性脂肪の蓄積が確認され、冠動脈においては 10 症例すべてに中性脂肪が蓄積していた。非糖尿病群と家族性高コレステロール血症群においては中性脂肪の蓄積が確認されなかった。

D. 考察

2 型糖尿病は TGCV のリスクとなりうることが示唆される。

E. 結論

本年度の研究により 2 型糖尿病と TGCV の関連が示唆された。今後はさらに症例数を増やし、2 型糖尿病における TGCV 発症率を評価する必要がある。

F. 健康

なし

G. 研究発表

なし

H. 特許

なし

ATGL 欠損症患者に対する中鎖脂肪酸食事療法に関する研究

研究分担者 隅 寿恵 大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学講座神経内科学 助教

研究要旨

約 20 年の経過で徐々に四肢筋力低下が進行した 40 代女性の ATGL 欠損症患者に対して中鎖脂肪酸を主体とした脂質摂取による食事療法を開始した。体重は 2 カ月で 4kg 増加し、四肢冷感と動作の安定性が軽度改善した。

A. 研究目的

ATGL 欠損症患者において中鎖脂肪酸を主体とした脂質摂取による食事療法の効果を判定する。

B. 研究方法

総脂肪酸摂取量 45g のうち、中鎖脂肪酸の摂取量を 1 ヶ月間で 30g まで漸増し、以後 2 ヶ月間継続した。退院へ向けて中鎖脂肪酸の摂取量を 20g へ減量し 1 週間後退院した。動作療法などのリハビリテーションは並行して行われた。

（倫理面への配慮）

専門の栄養士が食事療法について説明し、患者の同意を得た。食事療法開始後も患者の意見を取り入れ、受け入れ状況や気持ちにも配慮しつつ、治療を進めていった。

C. 研究結果

食事療法開始後、四肢の冷感が改善し、顔面の紅潮が出現した。2 ヶ月間で体重は 32kg から 36kg へと増加し、四肢の筋力は、MMT レベ

ル(5 段階)にて元々 0 から 1 レベルであった部位は変化なく、3+であった部位は 4-、4+であった部位は 4+など軽度の改善を認めた。握力は 10kg から 20kg へ増加した。ADL 上は、自覚症状に変化はなかったが、立ち上がりや立位保持、歩行などの動作に軽度安定性が増した。呼吸機能は%VC40.7%と拘束性換気障害を認めていたが 59.2%へ改善した。CT 画像上は筋萎縮の改善は明らかでなかった。

D. 考察

数ヶ月間の中鎖脂肪酸食事療法とリハビリテーションにて慢性進行性に悪化していた筋力低下が軽度改善した。退院後の食事療法が継続できるかどうかも含め、長期での治療効果を判定することが必要である。

E. 結論

ATGL 欠損症に対して中鎖脂肪酸食事療法が有効である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

冠動脈の質量顕微鏡による解析

研究分担者 瀬藤 光利 浜松医科大学 教授

研究要旨

動脈硬化を有する冠動脈の脂質の局在を質量顕微鏡法によって解析した。その結果、2型糖尿病患者群において、中性脂肪の局在異常があることを見出した。

A. 研究目的

TGCV は平野班長らのグループが発見した新規の疾患単位であり、心筋と冠動脈における中性脂肪の異常蓄積を特徴とする。平野班班員である財満の研究により、2型糖尿病患者においてTGCV様のフェノタイプが引き起こされる可能性が示されたため、質量顕微鏡を用いて2型糖尿病患者の冠動脈の脂質局在を解析した。

B. 研究方法

クライオスタットで $8\mu\text{m}$ の冠動脈切片を作成し、ITO (Indium Thin Oxide) コートしたスライドガラス上に接着させ、DHB (2,5-Dihydroxy benzoic acid) 溶液を塗布し、質量顕微鏡分析に供した。質量顕微鏡分析にはNd:YAGレーザー（波長 355nm、周波数 200Hz）を搭載した Ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics) を使用した。脂質局在解析はFlexImagingを用いた。実験は浜松医科大学の倫理委員会の承認を得て行った。

(倫理面への配慮)

本研究は倫理委員会の承認を受けた後、被験者に対してインフォームドコンセントを実施し書面にて同意を得た。

C. 研究結果

2型糖尿病患者群の冠動脈はアテローム巣を取り囲むように中性脂肪が局在していた。コレステロールエステル、スフィンゴミエリン、リゾホスファチジルコリンはアテローム巣に存在していた。非糖尿病患者の冠動脈には中性脂肪の異常が観察されず、コレステロールエステル、スフィンゴミエリン、リゾホスファチジルコリンの局在は2型糖尿病と一致した。

D. 考察

2型糖尿病患者の冠動脈には中性脂肪が特徴的に局在することがわかった。中性脂肪の局在場所には脂肪細胞は観察されなかったため、中性脂肪は細胞内に微小油滴として存在することが示唆される。中性脂肪が観察され

た場所は血管内皮細胞および血管平滑筋が存在する場所と一致するため、これらの細胞において何らかの中性脂肪代謝異常が引き起こされていることが示唆される。

E. 結論

今後は免疫染色と質量顕微鏡画像との比較により、中性脂肪が蓄積している細胞を同定する必要がある。同定した細胞における中性脂肪代謝異常を改善することにより、糖尿病性 TGCV の治療法の開発につながることを期待される。

F. 健康

なし

G. 研究発表

なし

H. 特許

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

TGCV の末梢血の脂質解析および血球 CD36 発現の検討

研究分担者 千葉 仁志 北海道大学大学院保健科学研究院 教授

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症 (TGCV) の末梢血を用いた診断法の確立を目的として、血清脂質、リポ蛋白、及び血球について解析した。血清脂質とリポ蛋白の代謝には異常を認めず、血球の脂肪滴蓄積は中性脂肪の異化障害によることが示唆された。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症 (TGCV) の末梢血を用いた診断法の確立を目的とする。

B. 研究方法

末梢血の脂質分析 (脂肪酸分画測定を含む)、リポ蛋白プロフィール、酸化リポ蛋白代謝、末梢血のスカベンジャー受容体 CD36 の発現の検討、血球の形態学的観察、血球脂肪滴の脂質組成の検討を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は北海道大学大学院保健科学研究院の倫理委員会の承認済みであり、被験者の同意書を得て実施した。

C. 研究結果

血清脂質、リポ蛋白プロフィールに異常を認めなかった。血清脂肪酸分画を総脂質画分と各脂質画分に分けて測定したところ、中鎖脂肪酸食による治療により長鎖脂肪酸の低下が観察された。末梢血液像では、好中球、好酸球、単球、リンパ球に空胞を認めた。血小板に空胞と大型血小板の増加を

認めたが、この点については更に症例を増やして検討する必要がある。血球の CD36 発現は正常だった。トリグリセリド高含有酸化リポ蛋白レベル及びそれに対する自己抗体レベルは正常レベルだった。血球カウンターのデータ解析、空胞の脂質染色(酵素法)、血中プラズマローゲン測定は進行中である。

D. 考察

血中の酸化変性リポ蛋白が増加していないこと、及び好中球 CD36 が発現していないことから、好中球脂肪滴は貪食によるものではなく、心臓と同様にトリグリセリドの代謝障害による可能性が示唆された。

E. 結論

TGCV を血清脂質・リポ蛋白から診断することは困難であるが、白血球を材料にすることで、診断の可能性があることが示唆された。