

201024011A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

原発性高脂血症に関する調査研究

平成 22 年度 総括研究報告書

研究代表者 山田 信博

平成 23 (2011) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書	1
原発性高脂血症に関する調査研究	
山田 信博	
II. 分担報告書	
1. フィブラート系薬物の血漿 Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type9 (PCSK9) への影響	11
小林 淳二	
2. 日本人における高度高中性脂肪血症（膵炎合併例を含む）の原因検索— —中性脂肪分解系に作用する諸因子とその意義—	14
白井 厚治	
3. 原発性高トリグリセリド血症におけるアポ A5、Angptl3, 4 の血中濃度	19
石橋 俊	
4. リポ蛋白リパーゼ (LPL) 遺伝子変異データベース update	25
後藤田 貴也	
5. 原発性高脂血症に関する調査研究	27
横山 信治	
6. 家族性 LCAT 欠損症に対する遺伝子細胞治療の開発	30
武城英明	
7. 急性冠症候群 (ACS) 患者のアキレス腱肥厚に関する研究—2年次の解析—	34
及川眞一	
8. 原発性高脂血症に関する調査研究	43
林 登志雄	
9. 家族性高コレステロール血症の遺伝子解析	46
斯波真理子	
10. 家族性 III 型高脂血症の診断のための簡易マーカーの開発	55
山下静也	
11. III型高脂血症の診断基準改定に関する研究	60
衛藤 雅昭	
12. 学童期における脂質異常症と体重の関連について	62
太田 孝男	
13. 心血管イベント発症における small dense LDL の意義	65
荒井 秀典	
14. 2型糖尿病男女における各種脂質検査値の冠動脈疾患発症リスクに及ぼす影響	70
曾根 博仁	
15. 2型糖尿病における冠動脈不安定プラークと脂質パラメーターとの関連	81
鈴木 浩明	
III. (資料)	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	85
V. 研究成果の刊行物・別刷	89

研究要旨

家族性高コレステロール血症、原発性高トリグリセリド血症、III型高脂血症、LCAT欠損症の遺伝子治療を中心に班研究を行った。

急性冠症候群におけるアキレス腱肥厚を有する患者は、触診で診断された患者が28%、触診ではアキレス腱肥厚は明らかでなかったがX線撮影で診断された患者が28%であり、全体の56%に認められた。若年で診断された家族性高コレステロール血症の過半が虚血性心疾患発症時に初めて家族性高コレステロール血症と診断されており、遺伝疾患としての家族性高コレステロール血症に対する一般医家の啓蒙が重要である。臨床的に家族性高コレステロール血症と診断された200名について遺伝子解析を行った。LDL受容体遺伝子異常が46%、ARH遺伝子異常が1%、PCSK9遺伝子異常が9%に認められた。LDL受容体変異例の96.8%、PCSK9変異例の80%がFH Index法により診断可能であった。

日本人における原発性高度高トリグリセリド血症におけるリポ蛋白リパーゼ欠損症の頻度は、対象とするトリグリセリド値によっても異なるが、10~35%であり頻度は低かった。原発性高トリグリセリド血症患者の一部にアポA-V遺伝子異常とangptl3の異常が認められ、これらが高トリグリセリド血症や急性膵炎併発に関与している可能性が示唆された。

家族性III型高脂血症は、リポ蛋白電気泳動のブロードβパターンと等電点電気泳動によるアポE表現型でアポE2/E2かアポE欠損を証明することで確定診断するが、RLP-C/TG比やアポB48/TG比も家族性III型高脂血症の診断に有用であった。特に、アポB48/TG比は薬物治療後の患者であっても家族性III型高脂血症の診断に有用であった。

低HDL血症は動脈硬化の危険因子であるが、HDL増加薬は現在 CETP 阻害薬が臨床試験中である。今回、カルパインもしくはカルモジュリン阻害薬により ABCA1 の分解を抑制することで、HDL 産生が増加することが明らかとなり、ABCA1 分解抑制が HDL 増加薬のターゲットとして有用であることが示された。

遺伝子導入脂肪細胞の自己移植することにより、目的蛋白を長期にわたり安定的に補充する方法開発するために LCAT 欠損症をターゲットにヒトに臨床応用するための基礎的な検討を行った。移植細胞はがん化しないことが *in vitro* および動物実験で明らかとなった。また、LCAT 欠損症患者血清への *in vitro* 添加試験で遺伝子導入前脂肪細胞の分泌する LCAT 蛋白が LCAT 欠損による HDL の成熟障害を改善した。また、移植時の細胞の scaffold としてフィブリンゲルが有用であることが明らかとなった。現在、臨床応用に向け、本研究計画を厚生労働省へ提出し、審議会での指摘事項について追加検討を行っている。

分担研究者

及川 眞一 日本医科大学内科学講座
教授

横山 信治 名古屋市立大学大学院医学系
研究科基礎医科学講座 教授

白井 厚治 東邦大学医学部附属佐倉病院
内科講座 教授

石橋 俊 自治医科大学内科学講座教授

太田 孝男 琉球大学医学部育成医学教授

武城 英明 千葉大学大学院医学研究院
教授

山下 静也 大阪大学大学院医学系研究科
准教授

後藤田貴也 東京大学医学部附属病院臨床
分子疫学講座 准教授

林 登志雄 名古屋大学大学院医学系研究
科老年科学 講師

荒井 秀典 京都大学人間健康科学研究科
教授

小林 淳二 金沢大学大学院医学系研究科
教授

斯波真理子 国立循環器病センター研究所
バイオサイエンス部 室長

衛藤 雅昭 奥羽大学薬学部疾患薬理学
教授

曾根 博仁 筑波大学大学院人間総合科学
研究科 教授

鈴木 浩明 筑波大学大学院人間総合科学
研究科 准教授

A.研究目的

PCSK9はLDL受容体を分解し高LDLコレステロール血症の原因となるが、フィブラート系薬が血漿PCSK9濃度に与える影響について検討した。高カイロミクロン血症を認めてもリポタンパクリパーゼ遺伝子異常を

認めない症例がある。このような疾患における遺伝子異常について検討を加えた。

HDLは動脈硬化に対して保護的に作用するが、低HDLコレステロール血症に対する有効な治療法はない。ABCA1はHDLの産生に重要な役割を有しており、ABCA1発現上昇はHDL産生を増加させる。このため、ABCA1の分解を抑制することでABCA1の発現量を増加させ、HDL産生を増加させることにより血漿HDL濃度を上昇させて低HDL血症を改善し、動脈硬化症の予防治療の技術開発を目指した。

家族性高コレステロール血症は、LDL受容体の遺伝子異常による遺伝性高コレステロール血症で、常染色体共優性遺伝形式をとる。ホモ接合体は一般人口100万人に1人、ヘテロ接合体は500人に1人と、頻度の高い遺伝性高コレステロール血症である。若年性の冠動脈疾患の頻度が高く、その早期診断と早期治療は重要な課題である。これまで、本研究班で新しい家族性高コレステロール血症ヘテロ接合体の診断基準(FH Index法)を作成し、その妥当性について検証し、感度良く家族性高コレステロール血症ヘテロ接合体を診断できることを報告してきた。また、急性冠症候群患者でアキレス腱肥厚を有する患者の頻度、FH Index法による家族性高コレステロール血症確診例もしくは疑い例の頻度が、いずれも約20%と高いことを明らかとした。本年度は、臨床的に家族性高コレステロール血症と診断された患者についてPCSK9遺伝子の解析を行い、臨床的に家族性高コレステロール血症と診断された患者におけるPCSK9遺伝子異常について検討を加えた。また、急性冠症候群で入院した患者に対してアキレス腱

軟線撮影と LDL 受容体遺伝子解析を行うことで、急性冠症候群における LDL 受容体遺伝子異常の頻度について検討を加えた。また、FH の高齢化についても検討した。

家族性 III 型高脂血症はアポ E の異常によって発症し、虚血性心疾患のリスクが非常に高い。リポ蛋白電気泳動でブロードβパターンを呈するのが特徴である。しかし、その診断確定にはアポ E 表現型もしくは遺伝型の解析が必要であり、これは保険適応となっていない。また、III 型高脂血症と診断されず見逃されている患者も多い。したがって、III 型高脂血症の診断のためのより簡便な指標を見出すことは重要である。

家族性レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) 欠損症は、希少な遺伝性脂質異常症である。現在、LCAT 欠損症に対する有効な治療法はなく、遺伝子治療による LCAT の補充を目指して、引き続き検討を行った。

小児においても肥満は血清脂質値に影響を与えるが、脂質異常値に対する体重の影響は明らかではない。本年度の研究では、学童期の脂質異常値と体重との関連について検討した。

Small dense LDL は冠動脈疾患と強い関連が認められるが、これまで small dense LDL を正確に測定する方法はなかった。今回、small dense LDL の新しいアッセイ法を用いて、small dense LDL と心血管疾患との関連について検討した。

2 型糖尿病は、心血管疾患の発症リスクが高く、脂質異常は 2 型糖尿病においても冠動脈疾患の独立した危険因子である。今回、各種脂質マーカーの冠動脈疾患発症予測因子としての有用性を、2 型糖尿病患者のコホ

ートおよび冠動脈 CT 所見により検討した。

B. 研究方法

1. 高トリグリセリド血症

1.1. フィブラート系薬と PCSK9

耐糖能異常を伴う脂質異常症患者 14 名を対象に、ベザフィブラートまたはフェノフィブラート投与前と投与後 8 週における血漿 PCSK9 濃度についてクロスオーバー法で検討した。

1.2. 原発性高トリグリセリド血症の病態解明

高度中性脂肪血症患者 69 例(女性 30 例、平均年齢 39.0 ± 19.3 歳)を対象に、LPL 蛋白量と活性、血清 Angptl3 蛋白定量、遺伝子検索 (LPL、GPIHBP1、Lmf1、アポリポタンパク A-V) を行った。

空腹時血清トリグリセリド値が 500mg/dl を超えたことのある 38 例に対し、LPL 蛋白量、LPL と HTGL 活性、血漿 angptl3 および 4、アポ A-V 濃度を測定し、血清トリグリセリド値との関連について検討した。

1.3. リポ蛋白リパーゼ遺伝子変異データベース update

I 型・V 型高脂血症ガイドラインを作成する過程において、ヒト LPL 遺伝子に関する情報を収集、整理した。

2. HDL 増加薬開発のための基礎的検討

プロブコール代謝物である spiroquinone (SQ) と diphenoquinone (DQ) の効果、カルモジュリン阻害薬 W7 が HDL 産生を増加させる機序について、細胞を用いた系で検討した。また、SQ と DQ を高コレステロール食負荷ウサギに投与し、大動脈壁への脂質沈着について検討した。

3. 家族性レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) 欠損症に対す

る遺伝子細胞治療の開発

ヒト LCAT 遺伝子導入脂肪細胞が分泌する LCAT 蛋白の機能発現評価を遊離コレステロールのエステル化能を³H-コレステロールを含む人工基質を用いて評価した。移植細胞の生着率向上を目的として、移植細胞懸濁液に混合する scaffold について移植細胞の機能評価を行った。

4. 家族性高コレステロール血症

4.1. 急性冠症候群患者と家族性高コレステロール血症

日本医科大学付属病院集中治療室に平成 22 年 10 月から平成 22 年 12 月の間に急性冠症候群として入室し、同意の得られた 18 例（女性 3 例）を対象とした。患者本人からの病歴聴取および家族歴の聴取、皮膚黄色腫やアキレス腱肥厚の有無などに関する診察と、血液生化学検査や冠動脈造影所見の収集、アキレス腱のレントゲン撮影と超音波検査、LDL 受容体遺伝子解析のための DNA 採取を行った。

4.2. 家族性高コレステロール血症患者の高齢化

名古屋大学医学部附属病院老年科に通院中の家族性高コレステロール血症患者を対象に、家族性高コレステロール血症患者の高齢化について検討した。

4.3. 家族性高コレステロール血症の遺伝子解析

国立循環器病センターに通院中の臨床的に家族性高コレステロール血症ヘテロ接合体と診断された 200 例を対象とし、LDL 受容体遺伝子、PCSK9 遺伝子、ARH 遺伝子についてダイレクトシーケンスを行った。

5. 家族性 III 型高脂血症の診断

すでに診断のついた脂質異常症患者につ

いてアポ B48 濃度を測定し、他の脂質マーカーとともに高脂血症の表現型別に比較検討した。

未治療の日本人 III 型高脂血症 26 名を対象とし、血漿中の脂質およびアポ E 表現型を測定し、III 型高脂血症の診断に有用である指標について検討した。

6. 学童期における高脂血症

沖縄県那覇市及び熊本県熊本市で行われている小児生活習慣病検診受診児（男児 755 名、女児 490 名）を対象に早朝空腹時の血清脂質、アポ B、インスリン、血糖を測定した。インスリン抵抗性の指標としては HOMA-IR を用いた。体重は BMI z-score (BMISD)を用いて評価した。

7. 心血管イベントと small dense LDL

日本人の一次予防コホートである吹田スタディの 2034 検体の血清を用いて small dense LDL コレステロール、LDL コレステロールをデンカ生研のホモジニアス法を用いて解析した。Small dense LDL コレステロール、LDL コレステロール、small dense LDL/LDL 比の 4 分位と心血管疾患発症率との関連について検討した。

8. 2 型糖尿病と心血管疾患

8.1. 血清脂質値と冠動脈イベント

日本人 2 型糖尿病患者コホート JDCCS のデータベースを用いて、開始後 8 年間に起きた冠動脈疾患について、その登録時の TC、LDLC、HDLC、TG、Non-HDL-C、TC/HDLC 比、LDLC/HDLC 比のデータを用い、既知の心血管危険因子で調整した、Cox の比例ハザードモデルによる多変量解析を行った。

8.2. 冠動脈 CT 所見と脂質値との関連

2 型糖尿病患者 355 症例のうち、IMT

(Intima-Media Thickness) 肥厚例、心電図異常例、運動負荷心電図にて陽性所見から無症候性心筋虚血が疑われ、冠動脈 CT (CTCA) を施行した 72 症例について検討を行った。臨床検査指標と冠動脈病変または冠動脈不安定プラークの有無で比較した。

(倫理的配慮)

各分担研究者の所属施設における倫理基準を遵守した。

C&D.研究結果と考察

1. 高トリグリセリド血症

1.1. フィブラート系と PCSK9

血漿 PCSK9 値の上昇は、ベザフィブラート、フェノフィブラートのいずれでも観察された。

PCSK9 は LDL 受容体の分解を促進するので、PCSK9 の発現上昇は、LDL を増加させる方向に働く。スタチンでも PCSK9 の発現上昇が認められる。これまでフェノフィブラートが PCSK9 値への影響に関する報告には、低下するという報告と、増加するという報告がある。スタチンとフィブラートでは、PCSK9 上昇の機序が異なると考えられている。今後、これらの機序をもとに PCSK9 の発現を阻害する薬剤が開発されれば、より効率的に LDL コレステロールを低下させることが可能となると考えられる。

1.2. 原発性高トリグリセリド血症の病態解明

高度高トリグリセリド血症 69 例中、LPL が正常である例は 63.8% と半数以上であった。アポ A-V 遺伝子の G185C 変異の頻度が正脂血症例に比べて高頻度であった。GPIHBP1 遺伝子、Lmfl 遺伝子の既知の変

異について検討したが、いずれの遺伝子でも変異例は認められなかった。血清 Angptl3 濃度は、正脂血症例に比べて高値の傾向が認められた。

一方、血清トリグリセリド値が 500mg/dl を超える症例 38 例での検討では、angptl3 もしくは angptl4 と血清トリグリセリド値、LPL 活性、HTGL 活性との間に有意な相関は認められなかった。アポ A-V 濃度と血清トリグリセリド値には有意な正の相関が認められた。著しいアポ A-V 値の低値を呈する症例にアポ A-V の複合ヘテロ接合体が認められた。

これら 2 つの研究結果から、アポ A-V の遺伝子異常が LPL 正常の高度高トリグリセリド血症の発現に関与していることが示された。Angptl3 と 4 の高度高トリグリセリド血症への関与については、今後の検討課題である。

1.3. リポ蛋白リパーゼ遺伝子変異データベース update

ヒト LPL 遺伝子上には 400 個以上の単一塩基多型が報告されており、世界的には、LPL 活性の変化に関連すると考えられる 163 例の変異/多型が同定され、このうち LPL 欠損症の原因となることが明らかな変異は 148 個報告されていた。日本人においては、LPL 活性の変化に関連する 35 個の変異/多型と、LPL 欠損症の原因となる 31 個の変異が報告されていた。

2. HDL 増加薬開発のための基礎的検討

SQ、DQ はともに ABCA1 mRNA 量に影響を与えることなく ABCA1 蛋白量を増加させた。これは、SQ、DQ が ABCA1 のカルパイン分解を抑制することが関与していた。高コレステロール食ウサギに SQ、DQ

を投与すると血漿 HDL は上昇し、8 週間投与によって、大動脈壁への脂質沈着は、いずれも有意に抑制されていた。

カルモジュリンは、ABCA1 とカルシウム依存的に結合すること、カルモジュリン発現抑制が ABCA1 の分解速度を上げ ABCA1 蛋白量と HDL 産生能を低下させた。一方、カルモジュリン阻害薬はカルモジュリンの ABCA1 への結合を増加させ、その結果、ABCA1 分解抑制による ABCA1 蛋白と HDL 産生の増加をもたらした。

低 HDL 血症を改善する薬剤は CETP 阻害薬が臨床試験中である。これらの結果は、ABCA1 の分解抑制をターゲットとした薬剤開発が、低 HDL 血症の治療と動脈硬化の予防につながる可能性を示唆している。

3. 家族性レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) 欠損症に対する遺伝子細胞治療の開発

ヒト LCAT 遺伝子導入前脂肪細胞から分泌された LCAT 蛋白を LCAT 欠損症患者血清に添加すると、添加した LCAT 蛋白の用量依存的にアポ A-I 含有 HDL が高分子側にシフトした。これは、添加した LCAT 蛋白が HDL の成熟に寄与したことを示している。現在、この解析系を患者適合性評価試験として確立すべく、LCAT 欠損症 15 症例を有するアムステルダム大学アカデミックメディカルセンターとの国際共同研究を進めている。

移植後の持続的な LCAT 産生を確保するための移植細胞の生着率向上を目的とする製剤化検討を実施した。臨床で手術の際に利用されているフィブリンゲルを移植細胞懸濁液に混合する scaffold として使用したところ、細胞の生存と LCAT 蛋白の血中へ

の分泌は、マウスでの移植実験で scaffold として頻用されるマトリゲルと同等の結果が得られた。

本研究は、すでに形成外科領域で行われている脂肪吸引、脂肪移植を応用して遺伝子導入脂肪細胞を製品化し、自己移植により目的蛋白を長期にわたり安定して補充するという、これまで医療経済的に蛋白補充が困難であった稀な難治性疾患に広く応用することが可能な新規技術である。

平成 22 年 4 月、厚生労働省へ遺伝子治療実施計画を申請し、厚生科学審議会により審査され、現在追加検討中である。

4. 家族性高コレステロール血症

4.1. 急性冠症候群患者と家族性高コレステロール血症

対象の平均年齢は 71 歳であった。アキレス腱肥厚が認められた患者は 5 例 (28%) で、レントゲン上もアキレス腱厚が 9mm 以上を呈していた。さらに、触診でアキレス腱肥厚なしとされた症例でも、5 例 (28%) がレントゲンでアキレス腱肥厚ありと診断され、全体で 10 例にアキレス腱肥厚が認められた。本研究班で提唱した新しい家族性高コレステロール血症診断基準である FH Index 法では、家族性高コレステロール血症の確診例が 0 例、疑い例が 11 例であった。

アキレス腱超音波検査で得られたアキレス腱前後径の最大値は、アキレス腱軟線撮影でのアキレス腱厚最大値と有意な正の相関を認めた。アキレス腱軟線撮影ではアキレス腱と軟部組織の境界が不明瞭で判定が困難な場合が認められるが、アキレス腱超音波検査は、このような症例でも比較的容易に境界を判断することができ、アキレス腱黄色腫の診断に利用出来る可能性がある。

4.2. 家族性高コレステロール血症患者の高齢化

65歳で区分すると、非高齢者群は37%が虚血性心疾患等のイベント罹患歴があり、過半がイベント発症時に初めて家族性高コレステロール血症と診断されていた。

家族性高コレステロール血症は常染色体共優性遺伝形式をとる遺伝疾患である。ヘテロ接合体は一般人口の500人に1人と頻度が高く、その診断は冠動脈疾患の予防の観点から重要である。それは、家族性高コレステロール血症と診断された患者の血縁者をスクリーニングして、家族性高コレステロール血症の早期診断と介入することが可能だからである。スタチンの登場によってLDLコレステロール値の管理が比較的容易となってからは、家族性高コレステロール血症患者の冠動脈疾患発症年齢も上昇している。しかし、本研究班でこれまで明らかとしてきたように、急性冠症候群では家族性高コレステロール血症を疑う症例が半数以上いることは、家族性高コレステロール血症という診断が適切になされていない現状を反映していることを示唆している。今後、一般医家への家族性高コレステロール血症診断の重要性について啓蒙していく必要がある。

4.3. 家族性高コレステロール血症の遺伝子解析

臨床的に家族性高コレステロール血症と診断された200例のうち、92例(46%)に29種類のLDL受容体遺伝子変異が検出された。そのうち、C338S変異は冠動脈疾患の合併が高頻度であった。PCSK9変異は、2種類、9例(9%)に認められた。ARH変異は1種類、2例(1%)に認められた。PCSK9

遺伝子変異による家族性高コレステロール血症は、LDL受容体変異によるものと比べて、未治療時のLDLコレステロール値およびアキレス腱厚は低値に分布していた。LDL受容体遺伝子変異例の96.8%、PCSK9遺伝子変異例の80%が、FH Index法により診断されることが示された。

LDL受容体遺伝子変異によって冠動脈疾患合併頻度が異なることは、LDL受容体遺伝子解析が家族性高コレステロール血症確定診断だけでなく、予後推定にも利用可能であることを示唆している。

PCSK9遺伝子変異は、家族性高コレステロール血症のなかでも比較的軽症であることが明らかとなったが、平成19年の本研究班で報告したFH Index法は、PCSK9による遺伝子変異例の家族性高コレステロール血症の診断にも有用であることが明らかとなった。また、ARHはホモ接合体において高コレステロール血症と巨大な黄色腫、若年性冠動脈疾患を発症する常染色体劣性遺伝疾患であるが、家族性高コレステロール血症ヘテロ接合体と診断された例にARHのヘテロ接合体の存在が明らかとなり、ARHの機能を解明する手がかりとなると考えられた。

今回遺伝子解析した症例のうち、44%にはLDL受容体、PCSK9、ARHに遺伝子変異は認められなかった。プロモーター領域の遺伝子変異や遺伝子の欠失例は診断出来ていないが、未知の遺伝子変異が存在する可能性もある。

5. 家族性III型高脂血症の診断

血清アポB48濃度は、I型、III型、V型高脂血症患者において有意に高値であった。アポB/TG比は、家族性III型高脂血症での

み有意に高値であり、投薬後でもその有意差は維持されていた。アポ B48/TG 比のカットオフ値は、0.064 (ROC 解析での感度 0.769、AUC=0.922) であった。

RLP-C/TG 比は 0.10 以上の症例が多く、III 型高脂血症の診断に有用である可能性が示唆された。

これまで、家族性 III 型高脂血症の診断には、大項目として、①血清総コレステロール、トリグリセリドがともに高値を示す、②リポ蛋白電気泳動でのブロードβパターン、③アポ E の異常 (アポ E2/E2、まれにアポ E 欠損) があげられている。さらに少項目として、①黄色腫 (特に、手掌線条黄色腫)、②血清アポ E 濃度上昇 (アポ E/TC 比が 0.05 以上)、③VLDL-C/TG 比が 0.25 以上、④LDL-C の減少、⑤動脈硬化性疾患の合併があげられている。この診断基準では、III 型高脂血症の診断には十分でない。この診断基準の作成された当時は、レムナントコレステロールやアポ B48 の測定は実用化されておらず、今後、今回のデータを加味した新しい III 型高脂血症の診断基準作成が望まれる。

6. 学童期における高脂血症

体重は、男児、女児ともに血清脂質と有意に相関していた。脂質異常値と体重の相関は、男児ではアポ B のみに認められたのに対し、女児では LDL-C をのぞく全てに有意な相関が認められた。しかし、その相関は HOMA-IR で補正すると女児の HDL-C 以外では消失した。以上から、肥満に認められる脂質異常症は高 LDL-C 血症以外はインスリン抵抗性による二次性の異常と考えられた。しかし、高 LDL-C 血症では、遺伝的な要因が強く関与している可能性が示唆

された。今後、高 LDL-C 血症児については、家族解析を行い、家族性高コレステロール血症や家族性複合型高脂血症の早期診断につなげていく必要があると考えられた。

7. 心血管イベントと small dense LDL

全体および男性において small dense LDL コレステロール値が高くなるほど冠動脈疾患の発症リスクが有意に増加することが明らかとなった。Small dense LDL の最も高い Q4 における冠動脈疾患の発症リスクは最も低い Q1 の 3~4 倍であった。女性においては、有意差が認められなかった。

本研究において、small dense LDL が日本人の一次予防コホートにおいて冠動脈疾患の発症と関連していることが明らかとなり、脂質管理において、LDL コレステロールとともに、small dense LDL コレステロール測定の意義があることが示唆された。女性においては有意差が認められなかったが、女性のイベント数が少なかったためと考えられ、女性における small dense LDL の意義を検討するためには、より大きなコホートにおける解析が必要であると考えられた。

8. 2 型糖尿病と心血管疾患

8.1. 血清脂質値と冠動脈イベント

男性においては、どの脂質パラメーターも、ハザード比が 1.2~1.6 と有意であり、non-HDL-C が最も鋭敏な指標であった。一方、女性においては non-HDL-C とトリグリセリド値が有意な指標であった。男女とも単一の指標で評価しようとするれば、non-HDL-C を用いることが最も妥当であると考えられた。

8.2. 冠動脈 CT 所見と脂質値との関連

高血圧、糖尿病罹病期間、頸動脈超音波

における max IMT が冠動脈病変の独立した予測因子であった。一方、冠動脈不安定プラークの独立した予測因子は、LDL-C/HDL-C (L/H) 比と頸動脈の不安定プラークであった。総コレステロール、LDL-C、non-HDL-C、トリグリセリド、HDL-C、L/H 比と冠動脈不安定プラークの個数との関連を解析すると、LDL-C、non-HDL-C、L/H 比と冠動脈不安定プラークの個数に有意な関連が認められた。これらの結果より、冠動脈プラークの不安定化には、脂質異常症が関与していることが示唆された。

E. 結論

1. 高度高トリグリセリド血症の発症には、LPL 変異に加え、アポ A-V 変異も関与している。

2. ABCA1 分解抑制は、低 HDL 血症治療薬のターゲットとして有用である。

3. 家族性 LCAT 欠損症治療におけるヒト LCAT 遺伝子導入自家前脂肪細胞移植の評価系と移植細胞の機能維持に必要な条件を確立した。

4. 急性冠症候群では、アキレス腱軟線撮影におけるアキレス腱肥厚症例が半数以上に認められ、少なくない数の家族性高コレステロール血症が存在している可能性があり、早期診断と介入が重要であると考えられた。また、LDL 受容体遺伝子解析により家族性高コレステロール血症の予後推定が可能であることが示唆された。

5. III 型高脂血症の診断に、アポ B48/TG 比、RLP-C/TG 比が有用である可能性が示唆された。

6. 学童期における高 LDL コレステロール血症は遺伝的な要因が強く、家族解析が必要である。

7. Small dense LDL は日本人の一次予防コホートにおいて冠動脈疾患の発症と関連している。

8. 2 型糖尿病の冠動脈イベントの予測には、non-HDL-C が最も有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Katayama S, Moriya T, Tanaka S, Tanaka S, Yajima Y, Sone H, Iimuro S, Ohashi Y, Akanuma Y, Yamada N. Low Transition Rate from Normo- and Low Microalbuminuria to Proteinuria in Japanese Type 2 Diabetics: the Japan Diabetes Complications Study (JDCCS). *Diabetologia* (in press)

2. Kodama S, Saito K, Tanaka S, Horikawa C, Saito A, Heianza Y, Anasako Y, Nishigaki Y, Yachi Y, Iida KT, Ohashi Y, Yamada N, Sone H. Alcohol Consumption and Risk of Atrial Fibrillation: A Meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* (in press)

3. Sone H, Tanaka S, Iimuro S, Tanaka S, Oida K, Yamasaki Y, Oikawa S, Ishibashi S, Katayama S, Yamashita H, Ito H, Yoshimura Y, Ohashi Y, Akanuma Y, Yamada N. Long-term lifestyle intervention lowers incidence of stroke in Japanese patients with type 2 diabetes: a

- nationwide multicenter randomised controlled trial. (the Japan Diabetes Complications Study) . *Diabetologia* 53:419-428,2010
4. Yamasaki Y, Nakajima K, Kusuoka H, Izumi T, Kashiwagi A, Kawamori R, Shimamoto K, Yamada N, Nishimura T. Prognostic value of gated myocardial perfusion imaging for asymptomatic patients with type 2 diabetes: the J-ACCESS 2 investigation. *Diabetes Care* 33: 2320-6, 2010
5. Yamamoto T, Watanabe K, Inoue N, Nakagawa Y, Ishigaki N, Matsuzaka T, Takeuchi Y, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Suzuki H, Yahagi N, Gotoda T, Yamada N, Shimano H. Protein kinase C β mediates hepatic induction of sterol-regulatory element binding protein-1c by insulin. *J Lipid Res* 51: 1859-70, 2010
6. Takeuchi Y, Yahagi N, Izumida Y, Nishi M, Kubota M, Teraoka Y, Yamamoto T, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Sekiya M, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Gotoda T, Ishibashi S, Itaka K, Kataoka K, Nagai R, Yamada N, Kadowaki T, Shimano H. Polyunsaturated fatty acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and autoloop regulatory circuit. *J Biol Chem* 285: 11681-91, 2010
7. Danno H, Ishii KA, Nakagawa Y, Mikami M, Yamamoto T, Yabe S, Furusawa M, Kumadaki S, Watanabe K, Shimizu H, Matsuzaka T, Kobayashi K, Takahashi A, Yatoh S, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. The liver-enriched transcription factor CREBH is nutritionally regulated and activated by fatty acids and PPAR α . *Biochem Biophys Res Commun* 391: 1222-7, 2010
8. 鈴木浩明, 高橋昭光, 矢藤繁, 小林和人, 古田淳一, 島野仁, 山田信博: 乳児期に著明な高コレステロール血症と黄色腫を発症し、胆汁酸吸着レジンが著効した 1 症例. *Progress in Medicine* 30: 556-62, 2010

H.知的所有権の取得情報

なし

研究要旨 PCSK9 は、LDL-R を分解し、高 LDL 血症の原因となり、近年、家族性高コレステロール血症 (FH) の新たな成因而として注目される。スタチンは LDL コレステロールを強力に低下させる一方、PCSK9 を増加させる。今回、フィブレート系薬物 (BEZ、FEN) 投与の血漿 PCSK9 濃度への影響を検討した。その結果、投与開始 8 週後で、FEN、BEZ いずれもその濃度を増加させた。したがってスタチン同様、フィブレートも PCSK9 濃度を増加させることより LDL- コレステロール低下作用を減弱させている可能性がある。将来的に PCSK9 阻害剤が開発されればこれらの脂質低下剤との併用により LDL-コレステロールを効率よく低下させることが出来ると考える。

A. 研究目的

PCSK9 (proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9) は、LDL-R を分解し高 LDL 血症の原因となる。近年、家族性高コレステロール血症 (FH) の新たな成因而として注目される。脂質低下剤スタチンは、細胞内のコレステロールプールを減少させ、SREBP2 を活性化させ、LDL-R の上昇とともに PCSK9 の発現を高めることが知られている。今回、フィブレート系の脂質低下剤が血漿 PCSK9 濃度にどのような影響を与えるかをベザフィブレート (BEZ) とフェノフィブレート (FEN) について比較検討した。

B. 研究方法

対象は、耐糖能異常を伴う脂質異常症患者 14 名

表1. Profile for the study subjects in group 1 and 2

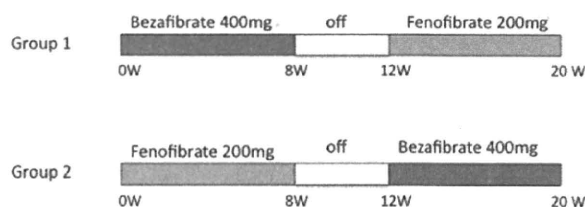
	Group 1	Group 2
Number of subjects, n (M/F)	6 (6/0)	8 (5/3)
Age, years	63.0 ± 18.2	58.6 ± 14.3
BMI, kg/m ²	26.3 ± 3.1	25.9 ± 3.3
Risk Factors, n (%)		
Hypertension	2 (33.3)	4 (50)
Diabetes mellitus	3 (50)	5 (62.5)
Current smoking	0 (0)	1 (12.5)
CAD	0 (0)	0 (0)
Medication, n (%)		
Anti-hypertensive	3 (50)	4 (50)
Anti-diabetes	3 (33.3)	2 (25)
Insulin	0 (0)	0 (0)
Anti-lipid	0 (0)	0 (0)

Values for age and body mass index are shown as mean ± SD.

BEZ と FEN の PCSK9 その他の代謝マーカーに及ぼす影響をクロスオーバー試験で比較した (図 1)。

データは BEZ、FEN 投与前と 8 週後の値をそれぞれまとめて解析した。統計解析は PASW 17.0.3 (SPSS, Chicago,

図1 Schedule



Illinois) を用いて行った。

C. 研究結果 (表 2)

BMI は投与前後で変化なし。γGTP は BEZ のみ改善。尿酸は FEN 投与でのみ低下を示した。また、血清インスリン値の低下、尿中 8-OHdG 低下、アディポネクチンの増加は BEZ でのみ観察された。次に血清脂質、リポ蛋白、アポ蛋白の変化を示す (表 2-2)。TG 低下、HDL-C 増加、ApoA1、A2 の増加は BEZ、FEN いずれでも観察された。一方、TC、NonHDL-C、ApoB の低下は FEN でのみ観察された。血漿 PCSK9 濃度の増加は BEZ、FEN いずれでも観察された。

表2-1 Effects of bezafibrate and fenofibrate on metabolic parameters

	Bezafibrate		Fenofibrate	
	Pre	Post	Pre	Post
BMI, kg/m ²	26.2 ± 3.2	26.0 ± 3.3	26.0 ± 3.0	26.0 ± 3.1
AST, U/L	34.6 ± 19.6	36.4 ± 18.5	32.8 ± 21.1	32.7 ± 14.5
ALT, U/L	47.1 ± 35.8	36.9 ± 21.4	42.7 ± 33.0	35.4 ± 21.0
γGTP, U/L	59.1 ± 43.8	36.1 ± 22.7**	55.6 ± 40.1	41.8 ± 23.9
Uric Acid, mg/dL	5.6 ± 1.3	6.0 ± 1.7*	5.9 ± 1.4	4.0 ± 1.3*** ††
PG, mg/dL	132.0 ± 28.8	121.6 ± 24.9	126.1 ± 25.2	124.9 ± 28.6
HbA1c, %	6.24 ± 0.83	6.18 ± 0.78	6.03 ± 0.71	6.25 ± 0.77*
Glycoalbumin, %	17.5 ± 4.2	16.8 ± 3.7	16.6 ± 3.0	17.5 ± 4.1
Insulin, mU/L	9.4 ± 5.0	7.8 ± 3.4*	9.4 ± 5.6	8.8 ± 3.9
Leptin, mg/mL	7.4 ± 5.0	7.3 ± 6.6	7.8 ± 7.6	8.3 ± 6.4
Adiponectin, μg/mL	6.5 ± 2.7	7.5 ± 3.1*	6.9 ± 3.1	7.1 ± 3.6
Urine 8-OHdG/Cre	10.5 ± 2.6	9.5 ± 1.7*	10.0 ± 2.7	9.6 ± 2.0

Values are shown as mean ± SD. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. pre-treatment value. †p<0.05, ††p<0.01, †††p<0.001 vs. bezafibrate

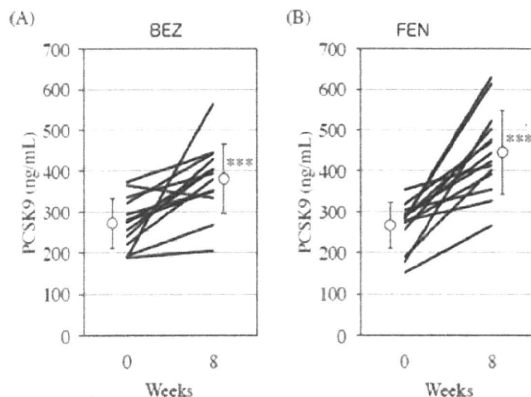
表2-2 Effects of bezafibrate and fenofibrate on metabolic parameters

	Bezafibrate		Fenofibrate	
	Pre	Post	Pre	Post
TC, mg/dL	211.1 ± 51.5	209.6 ± 44.2	216.3 ± 49.1	192.1 ± 40.4** ††
TG, mg/dL	196.4 ± 81.3	121.1 ± 52.7***	179.4 ± 77.1	120.3 ± 39.5***
HDL-C, mg/dL	44.4 ± 9.1	52.4 ± 10.6***	45.3 ± 9.2	50.6 ± 11.2***
LDL-C, mg/dL	127.5 ± 47.0	133.0 ± 36.8	135.1 ± 44.3	117.4 ± 33.5 †
non-HDL-C, mg/dL	166.8 ± 47.6	157.2 ± 41.0	171.0 ± 44.3	141.5 ± 36.5** ††
PCSK9, ng/mL	272.0 ± 62.0	380.0 ± 84.8***	266.7 ± 56.6	444.8 ± 101.3*** †
Apo A1, mg/dL	128.8 ± 18.1	141.4 ± 22.0***	130.7 ± 18.4	141.8 ± 19.4***
Apo A2, mg/dL	29.8 ± 4.3	40.7 ± 5.6***	30.3 ± 5.1	40.7 ± 4.9***
Apo B, mg/dL	107.4 ± 28.0	104.5 ± 24.2	112.2 ± 25.0	95.3 ± 21.6** ††
Apo C2, mg/dL	5.9 ± 2.7	5.2 ± 2.3	6.0 ± 3.1	4.9 ± 1.9
Apo C3, mg/dL	10.9 ± 3.7	8.8 ± 3.0**	11.2 ± 4.2	8.5 ± 2.3**
Apo E, mg/dL	5.3 ± 1.7	4.6 ± 1.0*	5.6 ± 2.3	4.9 ± 3.2

Values are shown as mean ± SD. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. pre-treatment value. †p<0.05, ††p<0.01, †††p<0.001 vs. bezafibrate

血漿 PCSK9 濃度の变化を個別の症例について以下に示す(図 2)。FEN では全例で、BEZ でも 1 例を除き、血漿 PCSK9 濃度の増加が観察された。

図2 Changes in PCSK9 during the treatment



D. 考察

今回のクロスオーバー比較試験の成績から、FEN, BEZ いずれも投与 8 週後、血漿 PCSK9 濃度を増加させることが判明し、その程度は前者でより強いことが示

唆された。過去、脂質異常症患者において、FEN の血漿 PCSK9 濃度への影響をみた臨床研究の報告は散見される。その中で、FEN が血漿 PCSK9 濃度を低下させる (Lambert; Chan)、増加させる (Mayne; Trout; Costet) と対立した成績が示されている。これらをよくみると投与後 PCSK9 が増加する、という報告の方がその程度がより強く、統計学的な有意差もより強い。今回の我々の成績は後者とコンセンサスがある。加えて、BEZ の影響を検討した点が斬新である。血漿 PCSK9 濃度への影響は FEN ほどではなかったが、やはり増加させた。その機序として、冒頭でも述べたとおりスタチンの場合は、細胞内のコレステロールプールを減少させ、SREBP2 を活性化させ、PCSK9 の発現を高める、と報告されているがフィブラートの場合は明らかでない。Costet らはアトルバスタチンと FEN の血漿 PCSK9 濃度への影響を検討し、前者では、投与開始 1 日後にすでに血漿 PCSK9 濃度への影響が出現する一方で、後者ではその時点では効果がまだ出現していない、ことを見出し、両者の PCSK9 増加のメカニズムが異なる可能性を示唆している。今後、これらの成績を踏まえ、PCSK9 を阻害する薬物が開発され、スタチン、フェブラートなどの脂質低下剤と併用することができれば、より効率的な LDL コレステロールの低下作用を期待することが出来る。また、今回の成績で、PCSK9 以外の知見として、BEZ と FEN を比較した場合、前者で、インスリン抵抗性改善に関するより好ましい作用を、後者には尿酸低下作用を期待することが出来ると思われた。また脂質に関して、コレステロール低下作用は FEN で顕著であり BEZ では明らかでなかった。

E 結論

フィブラート系脂質低下剤の血漿 PCSK9 濃度に及ぼす影響を耐糖能異常(+)の脂質異常症患者で検討した。その結果、FEN, BEZ いずれも、その濃度を増加させた。その増加させるメカニズムはスタチンとは異なると思われる。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Oka R, Miura K, Sakurai M, Nakamura K, Yagi K, Miyamoto S, Moriuchi T, Mabuchi H, Koizumi J, Nomura H, Takeda Y, Inazu A, Nohara A, Kawashiri MA, Nagasawa S, Kobayashi J, Yamagishi M Impacts of visceral adipose tissue and subcutaneous adipose tissue on metabolic risk factors in middle-aged Japanese. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18:153-60.
- 2) Moriuchi T, Oka R, Yagi K, Miyamoto S, Nomura H, Yamagishi M, Mabuchi H, Kobayashi J, Koizumi J. Diabetes progression from "high-normal" glucose in teachers at public schools. *Intern Med*. 2010;49:1271-6.
- 3) Nakajima K, Kobayashi J, Mabuchi H, Nakano T, Tokita Y, Nagamine T, Imamura S, Ai M, Schaefer E. Association of angiopoietin-like protein3 (ANGPTL3) with HTGL and LPL activities in human plasma *Ann Clin Biochem* 2010; 47: 423- 431
- 4) Nozue T, Higashikata T, Inazu A, Kawashiri MA, Nohara A, Kobayashi J, Koizumi J, Yamagishi M, Mabuchi H. Identification of a novel missense mutation in the sterol 27-hydroxylase gene in two Japanese patients with cerebrotendinous xanthomatosis. *Intern Med*. 2010;49:1127-31.
- 5) Kobayashi j, Noguchi T, Nohara A, Mabuchi H. Comparison of losartan versus ramipril on several adipocytokines and vascular remodeling biomarkers. *Hypertens Res*. 2011;34:52-4
- 6) Mabuchi H, Nohara A, Noguchi T, Kobayashi J, Kawashiri M, Tada H, Nakanishi C, Mori M, Yamagishi M, Inazu A, Koizumi J and the Hokuriku FH Study Group Molecular genetic epidemiology of homozygous familial hypercholesterolemia in the Hokuriku district of Japan. *Atherosclerosis*. 2011 ;214:404-407

学会発表

- 1) 小林淳二, 大家理恵, 野原 淳, 川尻剛照, 山岸正和, 馬淵 宏: 内臓脂肪型肥満患者におけるグラボノイドの有効性. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2010. 5. 27-29 岡山)
- 2) Kobayashi J, Oka R, Nohara A, Kawashiri M, Inazu A, Yamagishi M, Noguchi T, Mabuchi H. Effect of Licorice flavonoid oil on plasma lipids in subjects with abdominal obesity. 第 42 回日本動脈硬化学会総会 (2010. 7. 15・16. 岐阜)
- 3) 古市素江, 櫻井千佳, 八幡陽子, 河野貴子, 関軒裕佳, 小林淳二: 生活習慣の改善が困難な患者においてフォーミュラ食と栄養指導が減量に有効であった一症例. 第 31 回日本肥満学会総会 (2010. 10. 1・2 前橋)
- 4) 川尻剛照, 野原 淳, 野口 徹, 多田隼人, 中西千明, 森 千佳, 稲津明広, 小林淳二, 馬淵 宏, 山岸正和: 脂質低下剤投与後の PCSK 9 濃度に関する検討. 日本循環器学会 第 136 回東海・第 121 回北陸合同地方会 (2010. 11. 6・7 金沢)
- 5) Nakajima K, Kobayashi J, Mabuchi H: Association of ANGpTL3 with elevated HDL-C and decreased HTGL activity. The 6th International Atherosclerosis Society Sponsored Workshop on High Density Lipoproteins, (May 17-20, 2010, Whistler Canada)
- 6) Kawashiri MA, Noguchi T, Nohara A, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M, Ikewaki K: Impact of the LDL-receptor-related molecules on achievement of optimal LDL cholesterol level: evidence from newly identified gene mutations. (第 74 回日本循環器学会総会, 京都, 2010. 3. 5-7. Symposium 03)

H. 知的財産権の出願、登録状況

該当しない。

日本人における高度高中性脂肪血症（膵炎合併例を含む）の原因検索

—中性脂肪分解系に作用する諸因子とその意義—

分担研究者： 白井厚治 東邦大学医療センター佐倉病院、内科

研究協力者： 大平征宏、永山大二 同上

村野武義、 同上、研究開発部

高中性脂肪血症は高度になると急性膵炎を発症することがあり、その予防という点からも原因検索は必要である。高度高中性脂肪血症の原因として、従来から血中中性脂肪(TG)加水分解酵素であるリポ蛋白リパーゼ(LPL)に関する異常、すなわちLPL欠損症の遺伝子異常を中心に検討されてきたが、多くの症例で、それらに異常のないことが見出され原因の特定はまだ、十分にされているとは言い難い。近年、高度高中性脂肪血症の要因としてLPL、アポ蛋白C-IIに加え、アポ蛋白A-V遺伝子異常やLPL反応阻害因子であるAngiopoietin like-3(Angptl3)などの関与が報告されている。

今回、我々は急性膵炎を来した例も含む69例の高度高中性脂肪血症例について分析を行った。その中でLPL蛋白量、活性が異常な例は35%程度で残り60%強はLPL正常な例であった。LPL以外の要因としてアポC-IIの異常は今回認めず、GPIHBP1遺伝子異常およびLmf1遺伝子異常も認められなかったが、今回検索したアポ蛋白A-V遺伝子異常5種類のうちG185Cのみが高中性脂肪血症例で高頻度に認められ、またAngptl3蛋白量も増加している例も認められ、特にLPL正常型急性膵炎発症例でアポA-V G185C異常高頻度およびAngptl3高値傾向を認めた。これらがLPLが正常な例における高度高TG血症発症や急性膵炎併発に関連している可能性が示唆され、その詳細について今後更なる検討が必要と思われた。

A. 研究目的

高中性脂肪血症(高TG血症)は、比較的頻度の高い疾患であるが、高度な場合、しばしば急性膵炎を併発し、時に致死的な場合もある。この高度高TG血症の原因として、通常過食による合成亢進に加え、その根底には血中のTG水解酵素であるリポ蛋白リパーゼ(LPL)の作用低下が考えられる。LPLは血管内皮細胞表面に係留し、血中のカイロミクロン、超低比重リポ蛋白(VLDL)の中性脂肪を水解する酵素で、主に脂肪細胞で合成され、活性発現にアポ蛋白C-IIを必要とする。このLPLの欠損が要因である原発性I型高脂血症では、LPLの作用低下により血中TG濃度が3000mg/dl以上を呈する著しい高度高中性脂肪血症を認めることが知られ、その要因として、LPL遺伝子の異常であるLPL欠損症、LPLの活性促進因子であるアポC-IIの欠損(アポC-II欠損症)がある。家族性LPL欠損症は、その頻度が100万人に1人程度の稀な疾患である。LPL遺伝

子異常は、これまで全世界でエクソン全領域において50以上の変異が同定され、本邦においても20余りの例が報告されている。

一方、実際に高度高中性脂肪血症例のLPLについて調べてみると、LPLの異常が特定できない例もしばしば認められ、高中性脂肪血症発症におけるLPL以外の関与が考えられる。近年、血管新生因子と考えられていたAngiopoietin like-3(Angptl3)のLPL阻害作用が報告されて高TG血症発症への関与が示唆されつつあり、また高中性脂肪血症例においてアポ蛋白A-V(アポA-V)の遺伝子異常が同定され、高中性脂肪血症発症におけるアポA-Vの関与の可能性が考えられつつある。さらに最近、LPLの血管内皮細胞表面への係留に関連する蛋白と考えられているGlycosyl phosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1(GPIHBP1)やリパーゼの成熟に関与すると言われるLipase maturation

factor-1 (Lmf1) の遺伝子異常が高度高中性脂肪血症例において見出され、その関連が示唆されている。

今回、50 例の高度高中性脂肪血症（急性膵炎発症例含む）の原因検索に関する現状を明らかにする目的で検討を行った。

B. 研究方法

対象者：当院および他院より解析依頼のあった高度高中性脂肪血症 69 例（年齢は 0～75 歳。男性 39 例、女性 30 例、平均年齢 39.0±19.3 歳。）（表 1）を用いた。なお今回の対象例にて急性膵炎併発が 69 例中 12 例（17.4%）にて認められた。

方法：

LPL 蛋白量

ヘパリン静注 10 分後血漿（検査可能な症例（69 例中 44 例））についておよびヘパリン静注前血清を材料とし、モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法（積水メディカル）を用いて行った。

LPL 活性

検査可能な症例（69 例中 44 例）についてヘパリン静注を行い、静注 10 分後血漿を材料とし、1 M NaCl により LPL 活性のみが阻害される性質を利用した方法を用いて、得られた遊離脂肪酸量より算出した。

LPL 遺伝子異常の検索

末梢血（EDTA-2Na 入り採血管にて採血）から DNA を抽出し、その DNA を鋳型として PCR 法にて LPL 遺伝子領域を増幅し、直接塩基配列決定法にて塩基配列を同定した。また既に日本人で報告されている遺伝子異常のうちの 7 種類（Ex3 Y61X、Ex5 D204E、Ex5 A221del、Ex6 R243C、Ex7 A334T、Ex8 W382X、Ex9 S447X）について、制限酵素断片長多型（RFLP）法にて検出を行った。

GPIIb/IIIa 遺伝子解析

末梢血（EDTA-2Na 入り採血管にて採血）から抽出した DNA を鋳型として PCR 法にて GPIIb/IIIa 遺伝子領域を増幅した。既に報告されている遺伝子異常 2 種類（G56R、Q115P）について RFLP 法にて検出を行った。

Lmf1 遺伝子解析

末梢血（EDTA-2Na 入り採血管にて採血）から抽出した DNA を鋳型として PCR 法にて Lmf1 遺伝子領域を増幅し

た。既に報告されている遺伝子異常 2 種類（Y439X、W464X）について RFLP 法にて検出を行った。

アポ蛋白 A-V 遺伝子解析

末梢血（EDTA-2Na 入り採血管にて採血）から抽出した DNA を鋳型として PCR 法にてアポ蛋白 A-V 遺伝子領域を増幅した。既に報告されている遺伝子異常のうちの 5 種類（S19W、Q139X、Q145X、V153M、G185C）について RFLP 法にて検出を行った。

血清 Angpt13 蛋白量定量

検査可能な症例（50 例中 29 例）について血清を材料としてモノクローナル抗体を用いた ELISA 法（IBL）にて測定を行った。

C. 研究結果

1) 高度高中性脂肪血症例における postheparin LPL mass および LPL 活性による LPL 型別分類別分布と LPL 異常

Postheparin plasma 中の LPL 蛋白量、活性測定値より、対象例を欠損型（LPLmass<50、LPL 活性<2.0）、機能異常型（LPLmass>100、LPL 活性<3.0）、発現低下型（LPLmass: 50～150、LPL 活性: 2.0～4.0）、正常型（LPLmass>150、LPL 活性>4.0）の 4 群に分類した。（図 1）。

69 例中、欠損型は 7 例（10.1%）、機能異常型 4 例（5.8%）、発現低下型 14 例（20.3%）、正常型 44 例（63.8%）であった（表 2）。LPL 異常である欠損型、機能異常型、発現低下型を合計しても 25 例（36.2%）であり、対象例の半数以上は LPL が正常と考えられた。

なお今回の対象例にて LPL 遺伝子異常を検索したところ（表 2）、今回認められた変異例は LPL 欠損型、機能低下型、発現低下型といった LPL 異常が考えられる群で 25 例中計 6 例（Ex5. D204E 1 例 ex4 G215R 1 例及び Ex9. S447X 4 例）認められ、LPL 正常型でも S447X が 2 例認められた。

LPL 異常別に急性膵炎併発頻度を比較してみると LPL 異常例では 25 例中 5 例（20%）に比し、LPL 正常例では 44 例中 7 例（15.9%）と大きな相違は認めなかった。

2) 高度高中性脂肪血症例における GPIIb/IIIa 遺伝子異常頻度

高度高中性脂肪血症例において2種類の既知の GPIIb/IIIa 遺伝子変異 G56R、Q115P の頻度を検討したが、変異例は認められなかった。

3) 高度高中性脂肪血症例における Lmf1 遺伝子異常頻度

高度高中性脂肪血症例において2種類の既知の Lmf1 遺伝子変異 Y439X、W464X の頻度を検討したが、変異例は認められなかった。

4) 高度高中性脂肪血症例におけるアポ A-V 遺伝子異常頻度

高度高中性脂肪血症例においてアポ A V 遺伝子異常について検索したところ、今回検索した5種類の変異のうち G185C 保有例が認められ(表3)、正脂血症例に比して高頻度であった(表4)。LPL 群別に G185C 頻度を比較したところ LPL 欠損型、機能低下型に比して LPL 正常型、LPL 発現低下型で頻度増加を認め、LPL 群ごとに頻度の相違を認めた(表4)。

5) 高度高中性脂肪血症例での急性膵炎発症におけるアポ A-V 遺伝子異常 G185C との関連

急性膵炎併発有無別に G185C 頻度を比較したところ 非発症例: 57 例中 28 例 (49.1%) に比し、発症例では 12 例中 8 例 (66.7%) と高頻度傾向であり、特に LPL 正常例急性膵炎発症例 7 例中 5 例 (71.4%) と高頻度であった

6) 高度高中性脂肪血症例における Angpt13 蛋白定量

検査可能であった 29 例について血清中 Angpt13 濃度を測定したところ、 $374.6 \pm 207.6 \text{ ng/ml}$ と正脂血症例に比して高値傾向を認めた。また LPL 群別の平均値を LPL 異常症型別に比較したところ、正常例では欠損型や発現低下型といった LPL 異常例に比して高値傾向を認めた(表5)。しかし LPL 正常例の中でもばらつきを認め、一様ではなかった。

7) 高度高中性脂肪血症例での急性膵炎発症と血中 Angpt13 量との関連

急性膵炎併発有無別に血中 Angpt13 頻度を比較したところ、非発症例 $365.9 \pm 214.9 \text{ ng/ml}$ に比し、発症例で $401.8 \pm 195.6 \text{ ng/ml}$ と高値傾向であり、特に LPL 正常例急性膵炎発症例では $436.3 \pm 189.5 \text{ ng/ml}$ と高値であった。

D 考察

高中性脂肪血症は 40 歳以上の男性では半数近くが該当するとも言われ、比較的頻度が高い疾患ではあるが、 1000 mg/dl 以上になるような高度な例は極めて稀である。高度高中性脂肪血症の要因として考えられる病態として LPL 欠損症がある。LPL 欠損症は、その頻度が 100 万人に 1 人程度の稀な疾患であり、LPL 遺伝子異常が要因と考えられている。

また対象例について遺伝子解析をおこなったところ、LPL 遺伝子異常の頻度は 50 例中 7 例 (14.0%) であった。このことは高度高中性脂肪血症でも LPL 遺伝子異常頻度は決して高くなく、LPL 遺伝子異常以外の要因が大半であることを示唆していると考えられた。

この LPL 以外の要因として近年高度高中性脂肪血症にて見出されているアポ A V 遺伝子異常と GPIIb/IIIa 遺伝子異常と Lmf1 遺伝子異常について、その頻度を検討したところ、GPIIb/IIIa 遺伝子異常と Lmf1 遺伝子異常は今回の対象では認められなかったが、アポ A V では今回検索した5種類の変異のうち G185C 保有例のみが認められ、特に LPL 異常型に比して LPL 正常型で特に頻度増加傾向を認め、LPL 正常例における高 TG 血症発症への関与の可能性が示唆された。

また近年 LPL 反応阻害作用が報告されている Angpt13 について今回の対象例における血中濃度を見たところ、正脂血症例に比して高値傾向を認め、特に LPL が正常な例で高値傾向を認め、LPL が正常な場合の高中性脂肪血症に関連する可能性は示唆された。

次に高度高中性脂肪血症の重要な合併症である急性膵炎の併発と高中性脂肪血症の要因との関連について検討した。まず LPL 異常との関連について見たところ、LPL 異常例でやや高頻度であったが有意ではなく、LPL 異常の有無別で急性膵炎発症頻度は差を認めなかった。またアポ A V 遺伝子異常 G185C や Angpt13 との関連では特に LPL 正常例で高頻度、高値傾向を認め LPL 正常高度高中性脂肪血症例における発症要因および急性膵炎併発との関与が示唆されたが、その詳細は今後更に検討する必要があると思われた。

E 結論

以上の結果より、日本人高度高中性脂肪血症例における要因について検討したところ、LPL 遺伝子異常頻度は LPL 蛋白や活性が低下している場合でも多くなく、その要因解明には更なる検討が必要と思われた。また LPL 正常な例は半数程度認められ、LPL 以外の要因としてアポ AV 異常や LPL 阻害因子 (Angptl3) の関与が考えられる症例も認められたが、それらの高中性脂肪血症発症の関与については更なる検討が必要と思われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

準備中

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

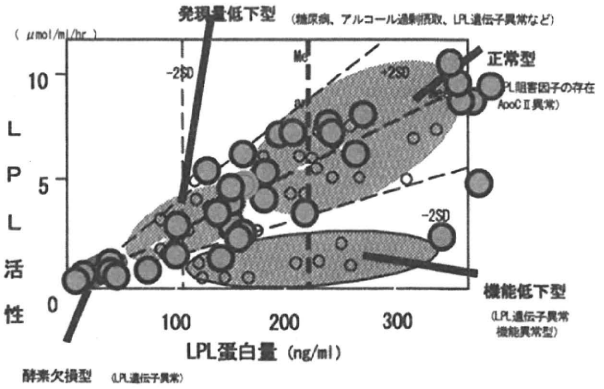


表 2 LPL 異常症別 LPL 遺伝子異常頻度

LPL 異常症分類	分布頻度	LPL 遺伝子解析		
		異常例	頻度	変異種類
欠損型	7 (10.1%)	3	42.9%	Ex9. S447X : 3 例
機能異常型	5 (7.2%)	2	25.0%	Ex5. D204E : 1 例 Ex5. G215R : 1 例
発現低下型	13 (18.8%)	1	11.1%	Ex9. S447X : 1 例
正常型	44 (63.8%)	2	3.7%	Ex9. S447X : 2 例 Ex5. D204E : 1 例
Total		8	14.0%	Ex5. G215R : 1 例 Ex9. S447X : 6 例

表 1. 高度高中性脂肪血症解析症例

表 3. 高度高中性脂肪血症例における ApoA V 遺伝子異常頻度

	53C>G (S19W)	415C>T (Q139X)	443C>T (Q145X)	457G>A (V153M)	553G>T (G185C)
homo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	11 (10.6%)
hetero	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	37 (35.5%)
WT	104 (100%)	104 (100%)	104 (100%)	104 (100%)	56 (53.8%)
Total	104	104	104	104	104

図 1 ヘパリン静注後血漿中 LPL 蛋白量及び活性と LPL 異常症の分類

表 4. LPL 異常症別 アポ A-V 553G-T 変異頻度

	アポ A-V 553G-T			LPL	急性膵炎	n	Angptl3 (ng/ml)
	Homo	Hetero	WT				
正脂血症	0/44 (0%)	1/44 (2.3%)	43/44 (97.7%)	LPL 異常型	発症	1	194.5
高度高 TG 血症	8/59 (13.5%)	24/59 (40.7%)	27/59 (45.8%)		非発症	4	390.3±313.9
欠損型	0/8 (0%)	2/8 (20.0%)	6/8 (80.0%)	LPL 正常型	発症	6	436.3±189.5
機能異常型	1/5 (20.0%)	1/5 (20.0%)	3/5 (60.0%)		非発症	18	360.6±198.8
発現低下型	3/12 (25.0%)	6/12 (50.0%)	3/12 (25.0%)	Total		29	360.6±198.9
正常型	4/34 (11.8%)	15/34 (44.1%)	15/34 (44.1%)				

表 5. LPL 異常症および急性膵炎発症有無別 アポ A-V 553G-T 変異頻度

LPL	急性膵炎	LPL 異常型		LPL 正常型	
		発症	非発症	発症	非発症
ApoA V	WT	2/5	10/20	0/3	15/32
	%	40	50	0	46.9
G185C	Mu	3/5	10/20	3/3	17/32
	%	60	50	100	53.1
Total		5	20	3	32

表 6. LPL 異常症別 血清 Anpt13 濃度

	測定 検体数	平均値
正脂血症	25	269.7±87.1
高度高 TG 血症	2	316.9±245.0
欠損型	1	790.9
機能異常型	2	165.6±40.9
発現低下型	23	386.2±196.9
正常型	2	316.9±245.0

表 7. LPL 異常症および急性膵炎発症有無別 血清 Anpt13 濃度