

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

LCAT 欠損症の病態とリポ蛋白解析

研究分担者 武城英明 研究協力者 黒田正幸、鎌田 貢壽、Erik S. Stroes
(千葉大学大学院医学研究院、千葉大学医学部附属病院、北里大学病院腎臓内科、
アムステルダム大学アカデミックメディカルセンター)

研究要旨 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、脂質異常症、腎不全、視力障害をともなう遺伝疾患であり、その原因となるLCAT変異が80種類程度同定されその病態は多岐に及ぶ。本研究目的は、LCAT欠損症の予後を規定する腎機能障害の病態に関連するリポ蛋白の解析とその治療反応性を明らかにすることである。同じ変異を持ちながら腎不全を発症した症例と未発症の症例、また、脂肪制限食による食事療法により腎機能の改善が見られた症例を経験し、その血清リポ蛋白のゲル濾過分画解析を元に、ゲル濾過で粒子サイズの大きなVLDL、LDL分画に腎機能と連動するリポ蛋白の存在を見出した。家族性LCAT欠損症 (FLD) と健常人、LCAT活性の部分欠損型である魚眼症 (FED) 症例との比較検討から腎機能障害を発症するFLDと発症しないFEDの間に同様の分画パターンの相違があることを見出した。このようにリポ蛋白のゲル濾過分画解析は、LCAT欠損症の病態把握に有用だった。今後は他のリポ蛋白解析法も組み合わせ、リコンビナントLCATの添加によりこの異常リポ蛋白にどのような質的变化がもたらされるのかを解析し、LCAT活性欠損に基づくリポ蛋白粒子サイズの変化と病態の変化の関わりについて解析を進める予定である。

A. 研究目的

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、脂質異常症、腎不全、視力障害をともなう遺伝疾患であり、現在まで 80 種類以上の遺伝子変異が存在し、その病態は患者により様々なことから治療法においては患者それぞれの予後を含めた病態の把握が治療に不可欠である。これまでに私たちは、LCAT 欠損症に対して、自己の脂肪組織から調製される LCAT 遺伝子導入脂肪細胞を用いた新規遺伝子細胞治療の開発研究を進め、現在、臨床導入に向けて現在は厚生労働省で審議中である。予後を規定する腎機能障害から腎不全へ至る発症機構はいまだ明らかにはなっていない。また、低 HDL 血症 (HDL 値 30~35mg/dL 以下) を呈する患者の約 3 割が LCAT 遺伝子異常のヘテロ接合体であるとの報告があり、動脈硬化のリスクファクターである。

本研究は、LCAT欠損症患者血清検体のリポ蛋白解析を実施し、その病態と予後に関する知見を得ることを目的とした。

B & C. 研究方法と結果

1. 用いた症例

今回の解析に用いた症例は、国内3症例（千葉大、自治医大、北里大）、オランダ5症例（アムステルダム大学アカデミックメディカルセンター）であり、それに健常人の4検体を加えた合計12検体で実施した。LCAT欠損症症例の内訳は家族性LCAT欠損症 (FLD) 4症例、魚眼病 (FED) 4症例である。いずれも血清におけるLCAT α 活性は健常人の1~2%程度であった。また、リポ蛋白二次元電気泳動とApoAIウェスタンブロット解析においてHDLの著しい成熟障害が認められた (図1)。

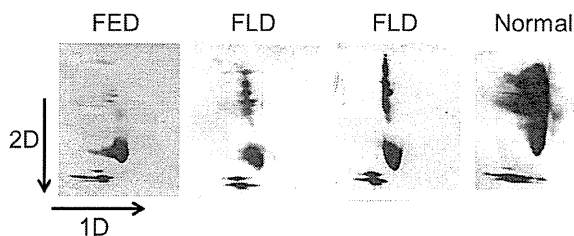


図1 患者血清でのHDL成熟障害

魚眼病 (FED) 患者、家族性LCAT欠損症 (FLD) 患者、健常人 (Normal) 由来血清 (いずれも国内検体) について二次元電気泳動後、ApoA Iに対するウェスタンブロットを行った。

2. 腎不全合併、非合併症例のリポ蛋白ゲル濾過分画解析

LCAT欠損症の病態とリポ蛋白異常との相関を検討するため、リポ蛋白の粒子サイズに着目し、それぞれの血清検体をゲル濾過で20個に分画し、それぞれの分画における総コレステロール (TC)、遊離コレステロール (FC)、トリグリセリド (TG)、リン脂質 (PL) の定量を行った。その結果、同じ変異 (C313Y) を持ちながら、腎不全の合併症例と非合併症例を経験し、粒子サイズの大きな分画 (VLDL、LDL相当分画) において、明瞭な相違を認めた (図2)。

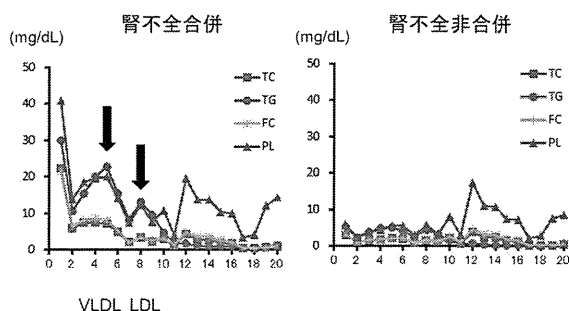


図2 腎不全合併、非合併症例の比較

C313Y変異を有する姉妹症例についてリポ蛋白ゲル濾過分画解析を実施した。

3. 新規国内症例の同定と脂肪制限食事治療の効果

61歳の女性。全身浮腫とネフローゼ症候群の疑いで入院し、一週間の蛋白制限食による食事療法による腎機能の改善が認められず、その後腎生検結果によりLCAT欠損を疑い、脂肪制限食での食事療法に変更、腎機能 (クレアチニン、尿蛋白値) に改善をみた。北里大

学病院からの遺伝子、リポ蛋白解析依頼を受け、遺伝子解析を実施した。本症例は遺伝子解析の結果C74Yという新規変異であり、LCAT蛋白においてHDL、LDLの認識を担うLid regionの形成に必要なジスルフィド結合を欠損する変異体であった (図3)。

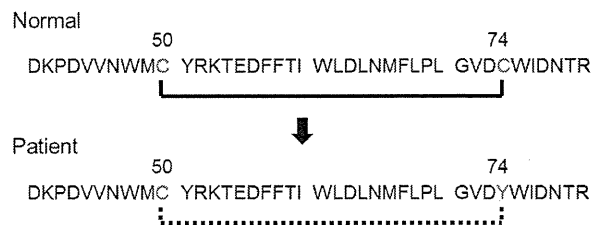


図3 FLD新規変異の同定

患者末梢血単核球よりゲノムDNAを抽出し、LCAT遺伝子領域の変異を検索した。LCAT蛋白におけるLid region (Tyr51-Asp73) 形成に必要なジスルフィド結合を形成するCys74がTyr残基に置換していた。

次に、脂肪食制限による食事療法の効果について検討した。脂肪制限食による食事療法の前後の血清についてリポ蛋白ゲル濾過分画解析を実施した。その結果、粒子サイズの大きな分画 (VLDL、LDL相当分画) においてリポ蛋白の減少を認めた (図4)。

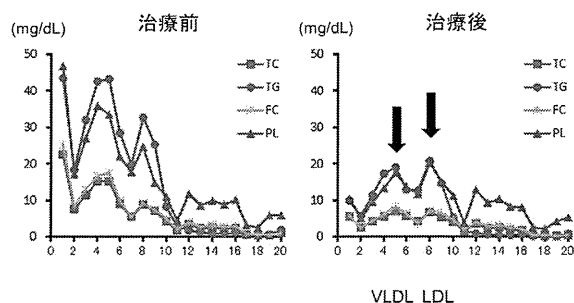


図4 FLD患者における脂肪制限食によるリポ蛋白プロフィールの変化

C74Y変異を有する症例について食事療法前後でリポ蛋白ゲル濾過分画解析を実施し比較した。

以上の解析から、腎機能障害の発現には、フラクシオン11までに認められる比較的サイズの大きいリポ蛋白が関与することが示唆された。

2. FLD、FED症例のリポ蛋白サイズ異常に関する解析

以上の結果を元に、他の症例についても解析を進め、健常人血清との相違に傾向が認められるかどうかを検

討した (図5)。

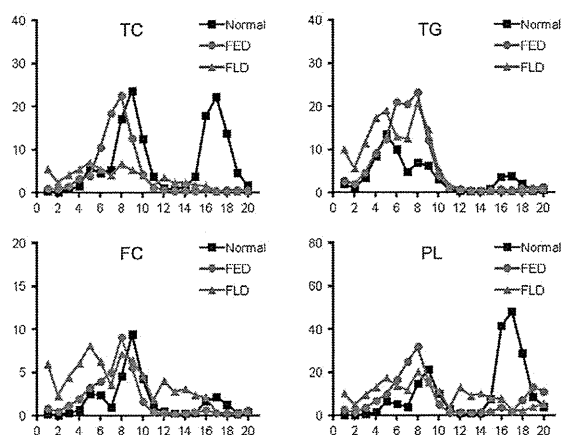


図5 FED、FLD症例におけるリポ蛋白の異常
FED、FLDの典型的な検体と健常人検体とを比較した。

この結果、フラクション11までのフラクションについて、健常人では5と9にピークを持つリポ蛋白粒子が存在しているのに対して、腎機能障害を合併しない病態であるFEDでは8にピークを持つものに変化し、さらに5のピークが不明瞭になること、腎機能障害を合併するFLDでは、5と8にピークを持つ粒子が存在していることが分かった (図6)。

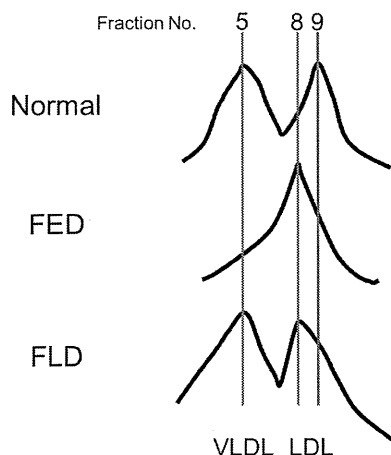


図6 FLD、FEDにおけるリポ蛋白サイズの異常
FLD、FED、健常人の解析より、健常人におけるVLDL、LDL分画付近について比較し、その傾向を図示した。

TG、PLの含有率も健常人とは異なり、これらの異常リポ蛋白が腎機能障害を含めたLCAT欠損症の病態と予後に関与することが考えられる。

(倫理面への配慮)

本研究は、千葉大学大学院医学研究院の規定に従い、国で定められている、ヒト生体由来細胞を用いた実験、組換え DNA 実験、動物取り扱いに関する指針に従い、千葉大学で開催される各委員会にて実験許可を受けて実施した。

D および E. 考察および結論

LCAT欠損症は希少疾病でありながら、その原因となるLCAT遺伝子異常は80種類にも及ぶ。そのため、病態が多岐にわたり、その網羅的リポ蛋白解析は実施されていない。本研究で用いたゲル濾過分画による解析法では、健常人との比較により、FLD、FEDのリポ蛋白プロファイルに統一的な見解が得られる可能性が示唆された。特に、VLDL、LDL分画領域に腎機能障害と関連する異常リポ蛋白の存在が示唆された。今後は、更なる症例の収集とともに、LCAT蛋白の添加によりこれらの異常リポ蛋白分画にどのような質的変化が引き起こされるかについても検討する。

また、低HDLを呈する症例の一部はその原因としてLCAT遺伝子のヘテロ接合体であることが外国で報告され、動脈硬化のリスクであることが明らかになった。今後は低HDL血症を検索の対象としさらに広く解析を行う予定である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Aoyagi Y, Kuroda M, Asada S, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Aso M, Okamoto Y, Nakayama T, Saito Y, Bujo H. Fibrin glue is a candidate scaffold for long-term therapeutic protein expression in spontaneously differentiated adipocytes *in vitro*. *Exp Cell Res*. 2012;318:8-15
- 2) Kuroda M, Bujo H, Aso M, Saito Y. Adipocytes as a vehicle for *ex vivo* gene therapy: Novel replacement therapy for diabetes and other

metabolic diseases. *J Diabet Invest.*
2011;2:333-340.

- 3) Asada S, Kuroda M, Aoyagi Y, Fukaya Y, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Aso M, Satoh K, Okamoto Y, Nakayama T, Saito Y, Bujo H. Ceiling culture-derived proliferative adipocytes retain high adipogenic potential suitable for use as a vehicle for gene transduction therapy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;301:C181-C185.

H. 知的財産権の出願、登録状況

特記事項なし

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

原発性高脂血症に関する調査研究

家族性高コレステロール血症診断基準作成のための多施設共同研究

研究分担者 荒井 秀典 京都大学人間健康科学科 教授

研究協力者 斯波真理子 国立循環器病研究センター特任部長

及川 眞一 日本医科大学教授

野原 淳 金沢大学特任准教授

横手幸太郎 千葉大学教授

山下 静也 大阪大学病院教授

研究要旨

本研究では、高 LDL コレステロール血症、腱黄色腫、および若年性心筋梗塞や狭心症を示す家族性高コレステロール血症（FH）ヘテロ接合体について、的確に診断できる診断基準作成を目的として、多施設共同研究を行った。国立循環器病研究センター、大阪大学、京都大学、金沢大学、日本医科大学に通院中の脂質異常症患者（続発性高脂血症は除く）の未治療時の血清脂質値、家族歴、アキレス腱肥厚などの臨床所見を解析し、FH 診断のための LDL コレステロールの基準として 190mg/dL に比べ、180mg/dL を用いたほうが、感度に優れており、特異度に差がないことを明らかにし、新しい診断基準を作成した。

A. 研究目的

高コレステロール血症、黄色腫、および早発性冠動脈疾患を示す家族性高コレステロール血症（FH）ヘテロ接合体の診断基準は垂井班が 1986 年に作成した後、改定が行われていない。垂井班が作成した診断基準の大項目には“LDL 受容体の活性低下ないしは異常”が含まれているが、現在一般臨床において LDL 受容体の異常を診断することは非常に困難である。従って、本研究は専門医を含めた一般臨床医が診断を行うための新たな FH ヘテロ接合体の診断基準作成を目的として、多施設共同研究を行うこととした。また、診断基準における LDL コ

レステロールのカットオフ値を決定するとともに新しい診断基準の感度、特異度を決定する。

B. 研究方法

1) 本研究は、国立循環器病研究センター、大阪大学、京都大学、京都予防医学センター、金沢大学、日本医科大学による多施設共同研究である。

2) 対象者：各共同研究施設受診歴のある脂質異常症患者 1400 例を対象とする。脂質異常症の抽出にはカルテの診断名をもとに行う。

3) 新しい FH の診断基準としては、山田班

における研究成果を元に以下のものを用いることとした。

1. 高 LDL コレステロール血症
2. アキレス腱肥厚または皮膚結節性黄色腫が存在する（眼瞼黄色腫は除く）
3. 2 親等以内に FH の確定診断を受けている、あるいは早発性冠動脈疾患の家族がいる。

1 から 3 のうち 2 つ以上を満たしている患者を FH と診断する。

- 4) 評価項目：患者属性（年齢、性別、治療開始前 LDL コレステロール値、アキレス腱肥厚の有無、2 親等以内の FH または早発性冠動脈疾患の家族歴、LDL 受容体、PCSK9 等の遺伝子変異の有無、リンパ球 LDL 受容体活性）

今回の解析における FH、非 FH の診断は遺伝子解析で診断が明らかとなった FH 症例及び専門医による診断に基づくこととした。なお、本研究計画は国立循環器病研究センターによる承認を受けた後、実施した（主任研究者：斯波真理子）。

C. 研究結果

今回収集したデータは 1397 名分であるが、欠損値があった 41 名を除く FH418 名、非 FH935 名、計 1356 名のデータを解析した。採血時の平均年齢は 56.6 歳、男性 46.6%、女性 53.4%である。FH でアキレス腱肥厚を認めるのは遺伝子変異の有無にかかわらず、約 65%であり、85%の FH に 2 親等以内の FH の家族歴があった（表 1）。

図1に未治療時のFH、非FHのLDLコレステロール値の分布を示す。FH群で明らかにLDLコレステロールの高値を認めたが、重なりも認められた。180mg/dLをカットオフ値と

すると180mg/dLの患者中、FHの頻度は63.4%であり、190mg/dLをカットオフ値とすると70.5%がFHとなった。なお、250mg/dL以上の集団では95%がFHであった。従って、LDLコレステロールが250mg/dL以上であれば、FHである可能性が極めて高い。

表2には遺伝子変異の有無別のLDLコレステロール値を示す。遺伝子変異有り、なし、及び未実施の3群におけるLDLコレステロール値をANOVAで比較すると遺伝子変異のない群のLDLコレステロール値は有意に有りの群に比べ低いことが明らかとなった。

次にLDLコレステロールのカットオフ値として180及び190mg/dLを採用した際にFHがどの程度診断できるかを検討した。表3に示すように、180mg/dL以上とした場合にFHの91.6%が含まれるが、非FHも24.2%含まれる。一方190mg/dL以上とした場合、FHの86.1%が含まれ、非FHの中でこれを満たすのは16.5%であった。

最後にLDLコレステロールのカットオフ値による診断基準の感度、特異度を決定した。その結果、LDLコレステロールのカットオフを180mg/dLとし、新診断基準の大項目のうち2つ以上を満たす場合をFHとすることにした場合、感度は94.5%、特異度は99.2%であった。一方、190mg/dLとした場合の感度は91.7%、特異度は99.2%であった。遺伝子変異によりFHが確診されている症例に限っても同じ傾向が認められた（表4）。従って、180mg/dLを用いたほうが、特異度は変わらず、感度が高いことが示された。

D. 考察

本研究において FH ヘテロ接合体の診断基準作成のため、多施設での共同研究を行

った。すなわち、高脂血症外来通院患者のデータを用いて今回作成した診断基準の中での LDL コレステロールのカットオフ値として 180mg/dL を用いたほうが妥当であると判断した。また、LDL コレステロールが 250mg/dL 以上の患者は高脂血症外来通院患者においても 5%ときわめて少ないことから、LDL コレステロールが 250mg/dL 以上の場合にはそれだけで FH を強く疑うことができることとした。

今回の検討はすべて高脂血症外来を行っている専門医が行ったものであり、非専門医が診断する際には家族歴の聴取がやや不正確となり、診断の精度が落ちることが懸念される。本診断基準はあくまで非専門医を含めた医師による診断のために作成したものであり、今後は非専門医に周知するとともに、非専門医における診断感度の検証を行う必要があると考えられる。

E. 結論

今回の研究結果を基に新しい FH ヘテロ接合体の診断基準を作成した。

大項目

1. 血清 LDL コレステロール値 180mg/dL 以上
2. アキレス腱肥厚あるいは皮膚結節性黄色腫
3. 2 親等以内の家族歴 (FH あるいは早発性冠動脈疾患)

以上 3 つのうち 2 つ以上を満たす場合、FH と診断することとした。

なお、本診断基準は続発性高脂血症を除外した上で診断し、1 あるいは 2 の 1 項目のみがあてはまる場合、注意深い経過観察／再検査 (半年～1 年以内)、家族に関する

さらに詳細な調査等が必要とした。さらに LDL コレステロール値が 250 mg/dL 以上の場合は、2、3 の項目があてはまらなくても FH が強く疑われると考えた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tamura Y, Murayama T, Minami M, Matsubara T, Yokode M, Arai H. Ezetimibe ameliorates early diabetic nephropathy in db/db mice. *J Atheroscler Thromb*, in press.

2. Ogita M, Utsunomiya H, Akishita M, Arai H. Indications and practice for tube feeding in Japanese geriatricians: Implications of multidisciplinary team approach. *Geriatr Gerontol Int*, in press.

3. Kanamori H, Yanagita M, Nagai K, Matsubara T, Takechi H, Fujimaki K, Hara A, Usami K, Fukatsu A, Kita T, Matsubayashi K, Arai H. Psychosocial quality of life of elderly hemodialysis patients using visual analogue scale: comparing with healthy elderly in Japan. *J Clin Gerontol Geriatr*, in press.

4. Yamada M, Aoyama T, Arai H, Nagai K, Tanaka B, Uemura K, Mori S, Ichihashi N. Complex obstacle negotiation exercise can prevent falls in community-dwelling elderly Japanese

- aged 75 years and older. *Geriatr Gerontol Int*, in press.
5. Yamada M, Uemura K, Mori S, Nagai K, Uehara T, Arai H, Aoyama T. Faster decline of physical performance in higher levels of baseline locomotive function in older adults, *Geriatr Gerontol Int*, in press.
 6. Yamada M, Arai H, Nagai K, Tanaka B, Uehara T, Aoyama T. Development of a new index for fall risk assessment in older adults. *Int J Gerontol*, in press.
 7. Arai H, Ouchi Y, Yokode M, Ito H, Uematsu H, Eto F, Oshima S, Ota K, Saito Y, Sasaki H, Tsubota K, Fukuyama H, Honda Y, Iguchi A, Toba K, Hosoi T, Kita T. Toward the realization of a better aged society—Messages from Gerontology and Geriatrics—. *Geriatr Gerontol Int*, 12:16-22, 2012.
 8. Arai H, Ishibashi S, Bujo H, Hayashi T, Yokoyama S, Oikawa S, Kobayashi J, Shirai K, Ota T, Yamashita S, Gotoda T, Harada-Shiba M, Sone H, Eto M, Suzuki H, Yamada N, Management of type IIb dyslipidemia. *J Atheroscler Thromb*, 19:115-124, 2012.
 9. Gotoda T, Shirai K, Ohta T, Kobayashi J, Yokoyama S, Oikawa S, Bujo H, Ishibashi S, Arai H, Yamashita S, Harada-Shiba M, Eto M, Hayashi T, Sone H, Suzuki H, and Yamada N, Diagnosis and management of type I and type V hyperlipoproteinemia. *J Atheroscler Thromb*, 19:1-12, 2012.
 10. Kanamori H, Nagai K, Matsubara T, Mima A, Yanagita M, Iehara N, Takechi H, Fujimaki K, Usami K, Fukatsu A, Kita T, Matsubayashi K and Arai H, Comparison of the psychosocial quality of life in hemodialysis patients between the elderly and non-elderly using a visual analogue scale: The importance of appetite and depressive mood. *Geriatr Gerontol Int*, 12:65-71, 2011.
 11. Tamura Y, Murayama T, Minami M, Yokode M and H Arai", Differential effect of statins on diabetic nephropathy in db/db mice. *Int J Mol Med*, 28: 683-687, 2011.
 12. Yamada M, Aoyama T, Arai H, Uemura K, Mori S, Nagai K, Tanaka B, Terasaki Y, and Iguchi M, Effect of resistance training on physical performance and fear of falling in elderly with different levels of physical well-being, *Age and Ageing*. 40: 637-641, 2011.
 13. Yamada M, Arai H, Nagai K, Uemura K, Mori S, Aoyama T. Differential determinants of physical daily activities in frail and nonfrail community-dwelling older adults. *J Clin*

Gerontol Geriatr, 2:42-46, 2011.

14. Mima A, Abe H, Nagai K, Arai H, Matsubara T, Araki M, Torikoshi K, Tominaga T, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T. Activation of Src mediates PDGF-induced Smad1 phosphorylation and contributes to the progression of glomerulosclerosis in glomerulonephritis. PLoS One, 6:e17929:1-11, 2011.

15. Akishita M, Arai H, Arai H, Inamatsu T, Kuzuya M, Suzuki Y, Teramoto S, Mizukami K, Morimoto S, Toba K. Survey on geriatricians' experiences of adverse drug reactions caused by potentially inappropriate medications: commission report of the Japan Geriatrics Society. Geriatr Gerontol Int. 11:3-7, 2011.

16. Yamada M, Aoyama T, Arai H, Nagai K, Tanaka B, Uemura K, Mori S, Ichihashi N. Dual-task walk is a reliable predictor of falls in robust elderly adults. J Am Geriatr Soc. 59:163-4, 2011.

学会発表

1. Arai H, Kokubo Y, Sawamura T, Okamura T, Impact of small dense low-density lipoproteins cholesterol on cardiovascular disease in an urban Japanese cohort: The Suita study, American Heart Association 2011, 2011年11月12-16日, オランダ、アメリカ

2. Arai H, Kokubo Y, M. Watanabe, Y.Miyamoto, T. Sawamura, T. Okumura, Small dense low-density lipoprotein is a risk for coronary artery disease in an urban Japanese cohort: the Suita study ESC(European Society of Cardiology) Congress 2011, 2011年8月27-31日, パリ、フランス

3. Arai H, Yokode M, Inflammation and MCP-1-mediated macrophage recruitment in adipose tissue and the liver, シンポジウム 3: The Role of Abdominal Organs in Atherogenesis, 第43回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2011年7月15-16日, 札幌

4. Arai H, Kobubo Y, Watanabe M, Miyamoto Y, Sawamura T, Okamura T Implication of small dense LDL as a risk for coronary artery disease in an urban Japanese cohort: The Suita study 第43回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2011年7月15-16日, 札幌

5. Arai H, Kita T, Metabolic Syndrome in elderly -Comparison between East and West -, IAGG VII EUROPEAN INTERNATIONAL CONGRESS, 2011年4月14-17日, ボローニャ、イタリア

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

表 1. FH の有無、遺伝子変異の有無別の患者背景。FH(Mut+) : 遺伝子変異が確認された FH、FH(Mut-) : 遺伝子変異が認められなかった FH、FH (Mut 未) : 遺伝子検査を行っていない FH。

| 背景因子 | 全体 | 非FH | FH | FH(Mut+) | FH(Mut-) | FH(Mut未) |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| N | 1356 | 937 | 419 | 223 | 41 | 155 |
| age | 56.6±17.2 | 58.3±16.3 | 52.9±18.6 | 50.9±20.2 | 68.0±11.5 | 51.4±15.9 |
| sex: male | 632(46.6) | 453(48.4) | 179(42.7) | 101(45.3) | 28(31.7) | 65(41.9) |
| アキレス腱肥厚:有 | 305(22.5) | 14(1.5) | 291(69.5) | 143(64.1) | 27(65.9) | 121(78.1) |
| 皮膚結節性黄色腫:有 | 59(4.4) | 4(0.4) | 55(13.1) | 21(9.4) | 11(26.8) | 23(14.8) |
| 2親等以内にFH既往者:有 | 417(30.8) | 60(6.4) | 357(85.2) | 219(98.2) | 41(100) | 97(62.6) |
| 2親等以内に若年齢冠動脈疾患既往者:有 | 164(12.1) | 34(3.6) | 130(31.0) | 63(28.3) | 14(34.1) | 53(34.2) |

図 1. FH、非FHにおける未治療時の LDL コレステロール値の分布

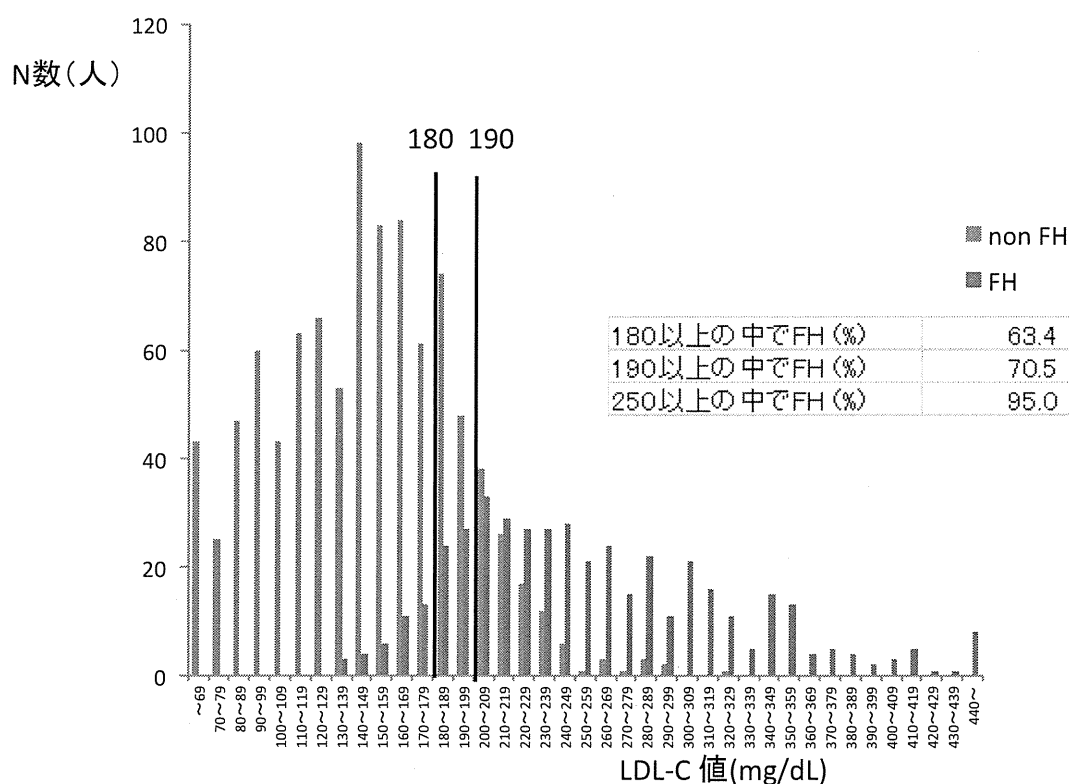


表 2. 遺伝子変異の有無での LDL コレステロール値の差。平均値、SD 及び中央値、IQ を示す。

| LDL-C値(mg/dL) | FH全体 | FH(Mut+) | FH(Mut-) | FH未実施 | <i>p-value</i> |
|---------------|-------|----------|----------|-------|----------------|
| N | 438 | 224 | 41 | 173 | |
| Mean | 257.4 | 266.2* | 229.0* | 252.9 | 0.003 |
| SD | 67.39 | 69.85 | 60.14 | 63.70 | |
| MEDIAN | 244 | 253 | 216 | 241 | |
| IQ | | | | | |
| 25% | 205 | 213 | 189 | 203 | |
| 75% | 300 | 308 | 244 | 295 | |

*p-value*は一元配置分散分析にて算出

*Bonferroni, $p < 0.005$

表 3. LDL コレステロールのカットオフを 180mg/dL, 190mg/dL 以上とした時の FH、非 FH の割合。FH (Mut+) : 遺伝子変異が確認されている FH

| 未治療時 LDL-C 値 | 非 FH | FH | FH (Mut+) |
|--------------|------|------|-----------|
| 180 以上 | 24.2 | 91.6 | 93.7 |
| 180 未満 | 75.8 | 8.4 | 6.3 |
| 190 以上 | 16.5 | 86.1 | 89.2 |
| 190 未満 | 83.5 | 13.9 | 10.8 |

表 4. 診断基準の大項目のうち 2 つ以上を満たす割合。LDL コレステロールのカットオフ値としてそれぞれ 180、190mg/dL を採用した場合の%を示す。FH (Mut+) : 遺伝子変異が確認されている FH

| LDL-C \geq 180 | 非 FH | FH | FH (Mut+) |
|------------------|------|------|-----------|
| あり | 0.8 | 94.5 | 94.6 |
| なし | 99.2 | 5.5 | 5.4 |
| LDL-C \geq 190 | | | |
| あり | 0.8 | 91.7 | 93.7 |
| なし | 99.2 | 8.3 | 6.3 |

研究分担者 小林淳二 金沢大学大学院医学系研究科脂質研究講座 特任教授

研究協力者 野口 徹、野原 淳、馬淵 宏 金沢大学大学院医学系研究科脂質研究講座

研究要旨 Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type9(PCSK9)は主に肝臓で LDL-R 分解を亢進させ、細胞膜表面の LDL-R 量を低下させる。そのためその機能が亢進すると高脂血症を、また機能が低下すると低脂血症を来す。今回、機能低下型の変異の一種と考えられる PCSK9 R93C の臨床的意義を詳細に検討した。一般健診集団では TC 値の第 1 四分位、第 2 四分位、第 3 四分位、第 4 四分位で PCSK9 の R93C 変異のキャリアを調べたところ TC 低値の群にこの変異の出現する頻度がより高かった(それぞれ 6.41, 6.58, 2.67, 1.37%)。この変異と W428X の compound heterozygote は TC, LDL-C 低下がより著しく、血漿 PCSK9 濃度も著明に低下していた。更に、LDL-R 変異+CETP 変異例に PCSK9 の R93C 変異をもつ一例を経験した。この症例は LDL-R 変異+CETP 変異例と比較して、高 TC, 高 LDL-C の程度がマイルドであった。

A. 研究目的

PCSK9(proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9)は、セリンプロテアーゼの一種で主に肝臓で LDL-R 分解を亢進させ、細胞膜表面の LDL-R 量を低下させる。そのため機能が亢進すると高脂血症を、また機能が低下すると低脂血症を来すことが知られている。今回、LDL 低下と関連する可能性のある PCSK9 R93C 変と W428X 変異の臨床的意義を詳細に検討したので報告する。

B. 研究方法

金沢大学循環器内科受診患者の血漿 PCSK9 濃度と総コレステロール(TC)の相関を調べた。また、302 名の一般健診受診者を TC 濃度で 4 群にわけ PCSK9 の R93C 変異の出現を調べた。PCR-RFLP 法による R93C 変異と W428X 変異の検出は下記 Primer を用いた。

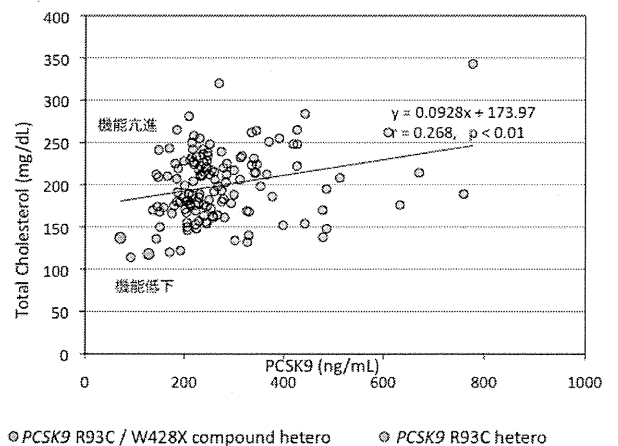
R93C Forward, CATCATGTTCTCCTTGCAT;
Reverse, GAAGTGCCATTTCCCAAAAAG;
制限酵素 Alw44 I

W428X Forward, CACCATCTTTACCATTACACC
Reverse, ACCCTGCCATCCTGCTTAC
制限酵素 Hinf I

PCSK9 濃度は ELISA キット(CycLex, Nagano, Japan)

を用いて測定した。

図 1 血漿 PCSK9 濃度と総コレステロールの相関
(金沢大学循環器内科 non-FH 症例(n=140))



(倫理面への配慮) 遺伝子解析はすべての患者から事前に承諾書を文書で得た上で行った。

C. 研究結果

当院循環器内科受診患者での血漿 PCSK9 濃度と TC との関連性を示す(図 1)。両者は正相関を示した(p<0.01)。この回帰直線より上を PCSK9 機能亢進(PCSK 蛋白増加程度より実際の TC 値が高い)、下を機能低下(PCSK9 蛋白低下程度より実際の TC 値が低い)と考えた。PCSK9 R93C 変異は図に示すように機能低下を伴っている可能性があった。次に、一

一般集団での PCSK9R93C 変異保有者と TC 値の関係を示す。一般健診集団では TC 値の第 1 四分位、第 2 四分位、第 3 四分位、第 4 四分位で PCSK9 の R93C 変異のキャリアがそれぞれ 6.41, 6.58, 2.67, 1.37% 検出され、血清 TC 値が低い群により高頻度にこの変異を認めた。また、血漿 PCSK9 濃度は TC の低い群でより低値の傾向を示した(表 1)。

次に PCSK9 R93C ヘテロと non-carrier の脂質、血漿 PCSK9 濃度を比較した成績を示す(表 2)

表 1 一般集団での PCSK9 R93C 変異保有者の分布

| | TC quartile | | | |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 1 (n=78) TC 114-173 | 2 (n=76) TC 174-194 | 3 (n=75) TC 195-223 | 4 (n=73) TC 224-343 |
| PCSK9 R93C Carrier(s) | 5 | 5 | 2 | 1 |
| % | 6.41% | 6.58% | 2.67% | 1.37% |
| TC (mg/dL) | 153.1 ± 15.9 | 183.6 ± 6.1 | 209.9 ± 7.8 | 243.1 ± 22.0 |
| TG (mg/dL) | 101.7 ± 51.1 | 115.4 ± 60.9 | 122.6 ± 57.7 | 141.5 ± 53.1 |
| HDL-C (mg/dL) | 44.8 ± 10.9 | 47.7 ± 11.8 | 50.0 ± 12.3 | 52.9 ± 14.4 |
| nonHDL-C (mg/dL) | 108.3 ± 18.5 | 135.9 ± 12.4 | 159.8 ± 13.9 | 190.1 ± 27.4 |
| LDL-C (mg/dL) | 87.9 ± 15.3 | 112.8 ± 13.1 | 135.3 ± 13.4 | 161.8 ± 24.4 |
| PCSK9 (ng/mL) (n=140) | 247.9 ± 104.1 (n=38) | 261.7 ± 127.4 (n=30) | 286.8 ± 111.6 (n=33) | 293.2 ± 123.5 (n=39) |

HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; Values represent mean ± S.D.

表 2 R93C 変異 W428X 変異と血清脂質、リポ蛋白、PCSK9 濃度

| | non-carrier | R93C | R93C + W428X |
|---|--------------------------|------------------------|---------------|
| n (%) | 289 (95.70%) | 12 (3.97%) | 1 (0.33%) |
| TC (mg/dL) | 197.9 ± 36.2 | 176.3 ± 31.4 * | 137 |
| TG (mg/dL) | 120.8 ± 57.7 | 103.8 ± 40.6 | 75 |
| HDL-C (mg/dL) | 48.9 ± 12.8 | 46.6 ± 9.2 | 40 |
| nonHDL-C (mg/dL) | 149.0 ± 35.7 | 129.8 ± 29.0 | 97 |
| LDL-C (mg/dL) | 124.8 ± 32.4 | 109.0 ± 27.4 | 78 |
| PCSK9 mass (ng/mL) (n=140) | 275.1 ± 116.7 (n=135) | 241.0 ± 77.4 (n=4) | 70.7 (n=1) |
| PCSK9 function (measured TC / calculated TC) (n=140) | 1.00 ± 0.19 (n=135) | 0.79 ± 0.17 * (n=4) | 0.75 (n=1) |

HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; TC, total cholesterol; TG, triglycerides

* P < 0.05 vs. non-carrier. Values represent mean ± S.D.

PCSK9 R93C ヘテロは non-carrier と比較して TC が 11.0% 低値 (176 ± 31 vs. 198 ± 36 mg/dL, p < 0.05)、TG が 14.1% 低値 (104 ± 41 vs. 121 ± 58 mg/dL)、LDL-C が 12.7% 低値であった (109 ± 27 vs. 125 ± 32 mg/dL)。また、血漿 PCSK9 濃度は non-carriers と比較し 12.4% 低値 (241 ± 77 ng/mL vs. 275 ± 117 ng/mL)。特に PCSK9 の R93C と W428X の compound ヘテロ症例は血漿 PCSK9 の低下と低 LDL-C (78 mg/dL) の程度が R93C 単独より高度であった。一般健診者の中で R93C の頻度は 3.97% (n=12) であり、一方 W428X は compound ヘテロの 1 症例以外に認められなかった。よって W428X は R93C と比較してその頻

度ははるかに低いと考えられる。この症例は、72 歳男性、60 本/日の喫煙歴と糖尿病を有し、冠動脈造影で、RCA #1 に 99% の狭窄を有していた。次に、当院循環器内科受診の家族性高コレステロール血症 (FH) 患者 (LDLR W159X ヘテロ) に R93C 変異をもつ症例が存在した (表 3)。この症例は 50 歳女性、LDL-R 変異、PCSK R93C 変異に加え、さらに CETP 遺伝子の splice donor site mutation of intron 14 を有した。この症例の LDL-C 増加は比較的マイルドであった。

表 3 FH+CETP 欠損症例との比較

| PCSK9 R93C +LDL-R W159X + CETP Int14+1G>A | FH+CETP 症例 | |
|---|------------|----------------|
| 50y 女性 | n | M/F=14/6 |
| TC | 313 | TC 330 ± 15 |
| TG | 64 | TG 112 ± 12 |
| HDL-C | 75 | HDL-C 60 ± 3 |
| LDL-C | 225 | LDL-C 251 ± 16 |
| A1 | 158 | A1 133 ± 8 |
| B | 144 | B 157 ± 14 |
| E | 4.2 | E 5.8 ± 0.4 |

Haraki et al. Atherosclerosis. 1997;132:229-236

D. 考察

今回の一般健診者、当院循環器内科受診した症例の解析結果から、PCSK9 の R93C 変異が低コレステロール血症の一つの成因であることが示唆された。Miyake らは、解析対象者を低 LDL-C 群 (n=78)、高 LDL-C 群 (n=96)、脂質低下剤服用群 (n=96) に分け、この変異の有無を調べている。それぞれの群で、本変異は 8 名、1 名、2 名存在し (すべてヘテロ)、低 LDL-C 血症との関連性を示唆している (Atherosclerosis 196; 29-36)。今回の我々の健診者の成績で、低 TC 群にこの変異の出現頻度がより高かった結果はこれを支持するものと考えられる。更に、同グループにより、W428X ヘテロは低 LDL (n=78) 群のみに 1 例みられた (Atherosclerosis 196; 29-36) と報告されているが、今回の検討では、W428X は R93C との compound ヘテロ症例一例にのみ認めただけである。その TC, LDL-C の低下の程度は R93C ヘテロ単独よりも著しく、更に PCSK9 蛋白量も著明に低下していた。更に、一例であるが、LDL-R 変異、PCSK R93C 変異に加え CETP 遺伝子の splice donor site mutation of intron 14 を有する症例を経

験した。この症例は当科で過去に経験した FH+CETP 欠損症例と比較し、TC, LDL-C の増加の程度がよりマイルドであった(表3)。このことから R93C 変異による LDL 低下効果が加算された脂質像を形成していると推測した。

今回、R93C 変異者はその PCSK9 濃度から予測される TC 値よりも低い TC 値を呈し、すなわち PCSK9 の濃度低下にくわえ機能低下を伴う可能性が考えられたがそのメカニズムは明らかではない。この変異により PCSK9 分子の prodomain の塩基性が減じることが(塩基性アミノ酸から中性アミノ酸への変異)、PCSK9 と LDL-R 分子との結合を弱め、その結果、PCSK9 による LDL-R 分解が低下し、LDL-R による LDL の取り込みが増加し、LDL-C 低下に繋がった可能性を推測している。これと逆に、以前報告した PCSK9E32K は酸性アミノ酸から塩基性アミノ酸への変異であり、塩基性が高まることにより、PCSK9 と LDL-R 分子との結合能が高まり、より LDL-R の分解が促進され、高コレステロール血症を引き起こしたと推測する。実際、Holla らは、PCSK9 分子の prodomain に存在する酸性残基を取り除くことにより、PCSK9 による LDL-R 分解が促進されることを in vitro で確認している(BBRC 2011)。

E. 結論

PCSK9 R93C、PCSK9 W428X 変異は低脂血症の成因になることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当しない

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kobayashi J, Noguchi T, Nohara A, Mabuchi H: Comparison of the effects of losartan vs. ramipril on several adipocytokines and vascular remodeling biomarkers. *Hypertens Res.* 34: 52-54, 2011
- 2) Mabuchi H, Nohara A, Noguchi T, Kobayashi J, Kawashiri MA, Tada H, Nakanishi C, Mori M, Yamagishi M, Inazu A, Koizumi J; Hokuriku FH Study Group: Molecular genetic epidemiology of homozygous familial

hypercholesterolemia in the okuriku district of Japan. *Atherosclerosis* 214: 404-407, 2011

- 3) Kawashiri MA, Kobayashi J, Nohara A, Noguchi T, Tada H, Nakanishi C, Inazu A, Mabuchi H, Yamagishi M: Impact of bezafibrate and atorvastatin on lipoprotein subclass in patients with type III hyperlipoproteinemia: result from a crossover study. *Clin Chim Acta.* 412: 1068-107, 2011

- 4) Nakajima K, Nakano T, Tokita Y, Nagamine T, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Stanhope KL, Havel PJ, Okazaki M, Ai M, Tanaka A: Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs. chylomicrons. *Clin Chim Acta.* 412: 1306-1318, 2011

- 5) Noguchi T, Kobayashi J, Yagi K, Nohara A, Yamaaki N, Sugihara M, Ito N, Oka R, Kawashiri MA, Tada H, Takata M, Inazu A, Yamagishi M, Mabuchi H: Comparison of effects of bezafibrate and fenofibrate on circulating proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and adipocytokines levels in dyslipidemic subjects with impaired glucose tolerance or type 2 diabetes mellitus: Results from a crossover study. *Atherosclerosis.* 217:165-170, 2011

- 6) Tada H, Kawashiri MA, Ohtani R, Noguchi T, Nakanishi C, Konno T, Hayashi K, Nohara A, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M. A novel type of familial hypercholesterolemia: Double heterozygous mutations in LDL receptor and LDL receptor adaptor protein 1 gene. *Atherosclerosis.* 219:663-666, 2011

- 7) Kawashiri MA, Nohara A, Noguchi T, Tada H, Nakanishi C, Mori M, Konno T, Hayashi K, Fujino N, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M. Efficacy and Safety of Coadministration of Rosuvastatin, Ezetimibe, and Colestimide in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 109:364-9, 2012

- 8) Ohtani R, Inazu A, Noji Y, Wakasugi T, Miwa K, Tada H, Kawashiri MA, Noguchi T, Nohara A, Kobayashi J, Koizumi J, Yamagishi M, Mabuchi H. Novel mutations of cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene in Japanese hyperalphalipoproteinemic subjects. *Clin*

Chim Acta. 413(5-6):537-43, 2012

9) Tada H, Kawashiri MA, Ikewaki K, Terao Y, Noguchi T, Nakanishi C, Tsuchida M, Takata M, Miwa K, Konno T, Hayashi K, Nohara A, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M. Altered Metabolism of Low-density Lipoprotein and Very Low-density Lipoprotein Remnant in Autosomal Recessive Hypercholesterolemia: Results from Stable Isotope Kinetic Study in vivo. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011 Dec 9.

2. 学会発表

- 1) Tada H, Takata M, Tetsuka N, Takenaka M, Noguchi T, Nakanishi C, Mori M, Kawashiri MA, Nohara A, Inazu A, Kobayashi J, Yamagishi M, Mabuchi H
Identification of a Novel Mutation for Sitosterolemia: An Infantile Case with Severe Hypercholesterolemia and Systemic Xanthomatosis Resembling Homozygous Familial Hypercholesterolemia. 第43回日本動脈硬化学会総会 July 16-17, 2011 (札幌)
- 2) Kawashiri MA, Oka R, Kobayashi J, Noguchi T, Tada H, Nakanishi C, Mori M, Nohara A, Inazu A, Yamagishi M, Mabuchi H. Oral supplementation of Coenzyme Q10 to hypercholesterolemic patients under statin therapy: A prospective randomized double-blinded pilot study. 第43回日本動脈硬化学会総会 July 16-17, 2011 (札幌)
- 3) Kawashiri MA, Nohara A, Noguchi T, Tada H, Nakanishi C, Mori M, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M
Elevation of PCSK9 levels after statin therapy: study with different types of lipid lowering drugs
第43回日本動脈硬化学会総会 July 16-17, 2011 (札幌)
- 4) Kawashiri MA, Ikewaki K, Tada H, Noguchi T, Nohara A, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H and Yamagishi M
Impaired LDL catabolism and increased VLDL and VLDL remnant production in homozygous familial hypercholesterolemia with PCSK9 gene mutation. 第75回日本循環器学会総会 (Yokohama) August 3-4, 2011
- 5) Tada T, Kawashiri MA, Nakanishi C, Hodatsu A, Mori M, Tsubokawa T, Konno T, Hayashi K, Uchiyama K, Nohara A, Fujino N, Ino H, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M
Impact of Double Heterozygous Mutation in LDL Receptor

(LDLR) and LDL Receptor Adaptor Protein 1 (LDLRAP1) gene on Clinical Phenotype of Atherosclerosis

第75回日本循環器学会総会 August 3-4, 2011 (横浜)

- 6) Tada H, Kawashiri MA, Nakano T, Nakajima K, Nakanishi C, Tsubokawa T, Konno T, Hayashi K, Uchiyama K, Nohara A, Fujino N, Ino H, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M
Altered Metabolism of Post-prandial Remnant Lipoprotein Fractions in Autosomal Recessive Hypercholesterolemia. The 84th American Heart Association 2011 Scientific Sessions Nov.12-16, 2011 (Orlando)
 - 7) Tada H, Kawashiri MA, Nakanishi C, Hodatsu A, Mori M, Tsubokawa T, Konno T, Hayashi K, Uchiyama K, Nohara A, Fujino N, Ino H, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M.
A Novel Type of Homozygous Familial Hypercholesterolemia: Double Heterozygous Mutations in LDL Receptor and LDL Receptor Adaptor Protein 1 gene
The 84th American Heart Association 2011 Scientific Sessions Nov.12-16, 2011 (Orlando)
 - 8) Tada H, Kawashiri MA, Nakanishi C, Hodatsu A, Mori M, Tsubokawa T, Konno T, Hayashi K, Uchiyama K, Nohara A, Fujino N, Ino H, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M.
Lack of Association between Common p.T111I Variant in the Endothelial Lipase Gene and the Risk for Coronary Artery Disease in Familial Hypercholesterolemia: Insights from the Modulation of Phospholipids in the HDL Particles
The 84th American Heart Association 2011 Scientific Sessions Nov.12-16, 2011 (Orlando)
- ## H. 知的財産権の出願、登録状況
- 該当しない

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

2 型糖尿病患者の冠動脈病変予測と脂質異常

研究分担者 島野 仁（筑波大学医学医療系 教授）

研究協力者 鈴木浩明、藤原和哉、佐藤明、曾根博仁（筑波大学医学医療系）

研究要旨

リスクスコアが現在の冠動脈疾患の状態を予測できるかどうか、冠動脈疾患の既往のない 2 型糖尿病患者 125 例を対象に、冠動脈 CT を用いて検討した。冠動脈内腔の 50% 以上の狭窄を冠動脈病変、冠動脈病変を形成するプラークの CT 値が 50HU 未満かつ、positive vessel remodeling を有するプラークを不安定プラークと定義した。

冠動脈病変検出の areas under the curve (AUC) は、Framingham risk score (FRS) 0.766 (95% 信頼区間 0.680-0.852)、UKPDS リスクエンジン (UKPDS) 0.746 (0.659-0.833)、Japan atherosclerosis longitudinal study (JALS) 0.730 (0.640-0.819) であった。これらのリスクスコアに max-IMT を組み合わせると冠動脈病変の検出が有意に改善した。一方、リスクスコアに LDL/HDL 比を組み合わせると不安定プラークの検出が有意に改善した。以上の結果より、無症候性 2 型糖尿病患者において、リスクスコア単独でも冠動脈疾患の予測能は比較的良いが、IMT や LDL/HDL 比を組み合わせることで、より正確にリスクを評価できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

現在、様々な心血管疾患に関するリスクスコアが発表されており、日常臨床に活用されている。一般的にリスクスコアは未来の心血管疾患の予測能として使用されるが、必ずしも対象の現在の冠動脈の状態を評価できるかは明らかではない。また、リスクスコアの心血管予測能が十分高くないことも報告されている。さらに、欧米のリスクスコアは、アジア人の冠動脈疾患を正しく評価できないことも報告されている。一方、頸動脈内膜中膜複合体厚 (intima-media thickness, IMT) をリスクスコアに追加することで、心血管疾患の予測能が向上することが報告されている。

昨年度の本研究班の研究で、冠動脈疾患の既往のない 2 型糖尿病患者を対象に冠動脈 CT

(CCTA) を行い、頸動脈の最大 IMT (max-IMT) と LDL/HDL 比の組み合わせが、冠動脈狭窄病変や冠動脈不安定プラークの検出に有用であることを報告した。

今回我々は、リスクスコアが現在の冠動脈の状態を予測できるかどうかを明らかにし、これらのリスクスコアに max-IMT や LDL/HDL 比を加えることで冠動脈病変予測能が向上するかどうかを検討した。

B. 研究方法

2009 年 4 月から 2011 年 12 月までに筑波大学附属病院内分泌代謝・糖尿病内科に入院した 2 型糖尿病患者 355 症例うち、IMT 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、CCTA を施行した 125 症例について検討を行った。CCTA において 50%

以上の狭窄病変を冠動脈病変、そのうち CT 値<50HU かつ positive vessel remodeling を冠動脈不安定プラークとした。また頸動脈超音波検査において低輝度プラークもしくは潰瘍形成、壁表面不整を認めた場合、頸動脈複雑プラークとした。

使用したリスクスコアは、Framingham risk score (FRS), UKPDS risk engine (UKPDS), Japan Atherosclerosis Longitudinal Study (JALS)である。FRS と UKPDS は冠動脈疾患発症の 10 年リスク、JALS は急性心筋梗塞発症の 5 年リスクを評価するリスクスコアである。これらのリスクスコアの冠動脈病変および冠動脈不安定プラーク予測能について、リスクスコア単独もしくはリスクスコアと max-IMT, LDL/HDL 比との組み合わせによる指標における ROC 曲線、感度・特異度、陽性尤度比(PPV), 陰性尤度比(NPV)で評価した。更にリスクスコアを 3 分位とし、狭窄病変に対し max-IMT、不安定プラークに対し LDL-HDL, non-HDL を追加しリスクスコアへの追加効果を検討した。

C. 研究結果

Table 1 に冠動脈病変の有無に関する患者背景を、Table 2 に冠動脈不安定プラークの有無に関する患者背景を示す。冠動脈病変を有する患者では、男性と高血圧、糖尿病網膜症、複雑頸動脈プラークの割合が有意に多く、年齢および糖尿病の罹病期間、LDL/HDL 比、max-IMT, FRS, UKPDS, JALS が有意に高く、HDL-C が有意に低かった。同様に、冠動脈不安定プラークを有する患者では、男性と喫煙、スタチン使用、アスピリン使用、複雑プラークの割合が有意に高く、LDL-C および non-HDL-C、LDL/HDL 比、max-IMT, FRS, UKPDS, JALS が有意に高く、HDL-C および eGFR が有意に低かった。

リスクスコアを 3 分位にして検討すると、FRS, UKPDS, JALS とともに、リスクスコアが増加すると、冠動脈病変を有する患者の割合が有意

に増加した (Figure 1)。リスクスコアに max-IMT の 3 分位を加えると、T2 で冠動脈病変の予測能が有意に向上した (Figure 2)。JALS においては、T1 でも冠動脈病変の予測能が有意に改善した。

冠動脈不安定プラークに関しては、FRS, UKPDS, JALS とともに、リスクスコアが増加すると冠動脈不安定プラークの割合が増加した (Figure 3)。冠動脈不安定プラークに LDL/HDL 比を加えると UKPDS の T3 と JALS の T2 において冠動脈不安定プラークの予測能が改善した (Figure 4)。

D. 考察

今回の検討で、冠動脈疾患の既往のない 2 型糖尿病患者において、リスクスコアが冠動脈 CT にて評価した冠動脈プラーク病変を予測することが可能であること、リスクスコアに max-IMT を組み合わせることで冠動脈の狭窄病変の予測能を有意に改善させること、リスクスコアに LDL/HDL 比を組み合わせることで冠動脈不安定プラークの予測能を有意に改善させることを示した。

FRS に max-IMT を加えることで、将来の心血管イベントの予測能が向上することが、一般住民を対象とした研究および日本人 2 型糖尿病患者を対象とした研究で示されている。本研究も、冠動脈病変については max-IMT と組み合わせることで各リスクスコアの予測能が向上した。特に、T1、T2 といった比較的リスクの高くない患者で予測能が向上しており、臨床での有用性が高いと考えられた。

冠動脈不安定プラークについては、LDL/HDL 比の組み合わせで予測能が向上しており、冠動脈プラークの不安定化には脂質異常の関与が大きいことが示唆された。不安定プラークについては、T1~T3 の全てにおいて冠動脈不安定プラークの検出能が向上している可能性が示唆された。

冠動脈病変や冠動脈不安定プラークの予測のために max-IMT や LDL/HDL 比を組み合わせる場合、これらに閾値が認められる可能性がある。

冠動脈疾患のリスクは、欧米人のリスクスコア (FRS、UKPDS) と日本人のリスクスコア (JALS) で大きく異なるが、リスクスコアの点数と冠動脈病変もしくは冠動脈不安定プラークの割合の関係は、各リスクスコアともほぼ同一であり、各リスクが冠動脈病変に与える影響は人種によらないことが示唆された。

E. 結論

冠動脈疾患の既往のない Max-IMT や LDL/HDL 比を既存のリスクスコアに組み合わせることで、リスクスコアの冠動脈疾患予測能を向上させることができることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwasaki H, Naka A, Iida K, Nakagawa Y, Matsuzaka T, Ishii KA, Kobayashi K, Takahashi A, Yatoh S, Yahagi N, Sone H, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. TFE3 Regulates Muscle Metabolic Gene Expression, Increases Glycogen Stores, and Enhances Insulin Sensitivity in Mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2012** Jan 31. [Epub ahead of print]
2. Kodama S, Saito K, Tanaka S, Horikawa C, Fujiwara K, Hirasawa R, Yachi Y, Sone Y, Tada-Iida K, Shimano H, Ohashi Y, Yamada N, Sone H. Fasting and Post-Challenge Glucose as Quantitative Cardiovascular Risk Factors: A Meta-Analysis. *J Atheroscler Thromb.* 2012 Jan 11. [Epub ahead of print]

3. Teramoto T, Urashima M, Shimano H, Yokote K, Saito Y, LIVES Study Extension Group. A large-scale survey on cardio-cerebrovascular events during pitavastatin (LIVALO Tablet) therapy in Japanese patients with hypercholesterolemia. *Jpn Pharmacol Ther.* 2011 Sep; 39(9): 789-803.
4. Horikawa C, Kodama S, Yachi Y, Heianza Y, Hirasawa R, Ibe Y, Saito K, Shimano H, Yamada N, Sone H. Skipping breakfast and prevalence of overweight and obesity in Asian and Pacific regions: A meta-analysis. *Prev Med.* 2011 Oct;53(4-5):260-267. Epub 2011 Aug 27.
5. Hirasawa R, Saito K, Yachi Y, Ibe Y, Kodama S, Asumi M, Horikawa C, Saito A, Heianza Y, Kondo K, Shimano H, Sone H. Quality of Internet information related to the Mediterranean diet. *Public Health Nutr.* 2011 Sep 19:1-9. [Epub ahead of print]
6. Kumadaki S, Karasawa T, Matsuzaka T, Ema M, Nakagawa Y, Nakakuki M, Saito R, Yahagi N, Iwasaki H, Sone H, Takekoshi K, Yatoh S, Kobayashi K, Takahashi A, Suzuki H, Takahashi S, Yamada N, Shimano H. Inhibition of Ubiquitin ligase F-box and WD repeat domain-containing 7{alpha} (Fbw7{alpha}) (Fbw7{alpha}) causes hepatosteatosis through the Kruppel-like factor 5 (KLF5)/PPAR{gamma}2 pathway, but not SREBP-1c in mice. *J Biol Chem.* 2011 Nov 25; 286(47):40835-46. Epub **2011** Sep 12.
7. Totsuka K, Maeno T, Saito K, Kodama S, Asumi M, Yachi Y, Hiranuma Y, Shimano H, Yamada N, Ono Y, Naito T, Sone H. Self-reported fast eating is a potent predictor of development of impaired glucose tolerance in Japanese men and women: Tsukuba Medical Center Study. *Diabetes Res Clin Pract.* **2011** Dec; 94(3):

- e72-4. Epub 2011 Sep 9.
8. Saito Y, Tanaka Y, Aita Y, Ishii KA, Ikeda T, Isobe K, Kawakami Y, Shimano H, Hara H, Takekoshi K. Sunitinib induces Apoptosis in Pheochromocytoma Tumor Cells by Inhibiting VEGFR2/AKT/mTOR/S6K1 Pathways Through Modulation of Bcl-2 and BAD. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011 Aug 30. [Epub ahead of print]
9. Saito R, Matsuzaka T, Karasawa T, Sekiya M, Okada N, Igarashi M, Matsumori R, Ishii K, Nakagawa Y, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Sone H, Suzuki H, Yahagi N, Yamada N, Shimano H. Macrophage elovl6 deficiency ameliorates foam cell formation and reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Sep;31(9):1973-1979. Epub 2011 Aug 4.
10. Heianza Y, Hara S, Arase Y, Saito K, Fujiwara K, Tsuji H, Kodama S, Hsieh SD, Mori Y, Shimano H, Yamada N, Kosaka K, Sone H. HbA1c 5.7-6.4% and impaired fasting plasma glucose for diagnosis of prediabetes and risk of progression to diabetes in Japan (TOPOCS 3): a longitudinal cohort study. *Lancet.* 2011 Jul 9;378(9786):147-155. Epub 2011 Jun 24.
11. Amemiya-Kudo M, Oka J, Takeuchi Y, Okazaki H, Yamamoto T, Yahagi N, Matsuzaka K, Okazaki S, Osuga J, Yamada N, Murase T, Shimano H. Suppression of the Pancreatic Duodenal Homeodomain Transcription Factor-1 (Pdx-1) Promoter by Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c(SREBP-1c). *J Biol Chem* 2011 Aug; 12: 286(32): 27902-27914.
12. Yokote K, Shimano H, Urashima M, Teramoto T. Efficacy and safety of pitavastatin in Japanese patients with hypercholesterolemia: LIVES study and subanalysis. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2011 May; 9(5): 555-562.
13. Karasawa T, Takahashi A, Saito R, Sekiya M, Igarashi M, Iwasaki H, Miyahara S, Koyasu S, Nakagawa Y, Ishii K, Matsuzaka T, Kobayashi K, Yahagi N, Takekoshi K, Sone H, Yatoh S, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. Sterol regulatory element-binding protein-1 determines plasma remnant lipoproteins and accelerates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(8): 1788-1795.
2. 学会発表
1. 藤原和哉, 鈴木浩明, 佐藤明, 大崎芳典, 尾本美代子, 豊崎晶子, 平安座依子, 児玉暁, 斎藤和美, 小林和人, 矢藤繁, 高橋昭光, 山田信博, 曾根博仁, 島野仁. CT coronary angiography (CTA)による冠動脈不安定プラーク(VP)と関連する臨床指標に関する検討. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011年.
2. 島野仁, 藤原和哉, 岩崎仁, 小林和人, 矢藤繁, 高橋昭光, 鈴木浩明, 山田信博. 糖尿病患者の血中脂質管理における nonHDL コレステロールの有用性. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会.
3. Fujihara K, Suzuki H, Sato A, Ishizu T, Heianza Y, Kodama S, Saito K, Kobayashi K, Yatou S, Takahashi A, Yamada N, Sone H, Shimano H. Impact of serum lipid level on number of vulnerable coronary plaque (VP) detected by CT angiography (CTA) in asymptomatic patients with type 2 diabetes (T2DM). 第43回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2011.
4. Fujihara K, Suzuki H, Sato A, Heianza Y, Kodama S, Saito K, Kobayashi K, Takahashi A, Yatou S, Yamada N, Sone H, Shimano H. Evaluation of clinical predictors of vulnerable

coronary plaque detected by CT angiography in asymptomatic patients with type 2 diabetes(T2DM). 71th American Diabetes Association Scientific Sessions, San Diego, USA, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし