

Acute Coronary Syndrome in Japan: The
PACIFIC Registry. The 77th Annual Scientific
Meeting of the Japanese Circulation Society.
March 15-17, 2013

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（原発性高脂血症に関する調査研究事業）

分担研究報告書

「アポ蛋白B-48測定の基準値の設定と臨床評価」

分担研究者 山下静也 大阪大学大学院医学系研究科
総合地域医療学寄附講座 教授

研究要旨

食後にカイロミクロンレムナント(CM-R)の蓄積を食後高脂血症といい、多くの基礎研究からこのCM-Rは動脈硬化プラークの形成・進展に繋がることが示されている。我々はこのCM-Rの定量的マーカーであるアポB-48濃度測定を実用化し、昨年度の検討で空腹時アポB-48濃度が冠動脈狭窄罹患率と最も強く相関し他の動脈硬化性疾患リスク因子の重複で増悪する事を突き止めた。今年度は、まずCM-Rの健常者におけるスクリーニングを目指し検診例で空腹時アポB-48濃度を検討した。アポB-48濃度は、男性（閉経女性）、BMI 25kg/m^2 以上、脂質異常症およびメタボリックシンドローム（MetS）患者で有意に高値であり、これらのリスク因子数の増加に相関して上昇した。さらに脂質異常のない健常例では基準値上限 $5.7\ \mu\text{g/mL}$ 、基準範囲(平均 $\pm 1.96\text{SD}$); $0.74\text{-}5.65\ \mu\text{g/mL}$ であった。さらに、アポB-48濃度をCKD患者において検討した。アポB-48濃度は尿蛋白陽性群およびeGFR低値群がそれ以外より高値に分布し、logアポB-48濃度およびlogアポB-48/TG比は高eGFR尿蛋白陰性群に比較して高eGFR尿蛋白陽性群、低eGFR尿蛋白陰性群、低eGFR尿蛋白陽性群で有意に高値であり、その有意差は他の測定項目の中で最も強かった。eGFRはlogアポB-48濃度とlogアポB-48/TG比と強く逆相関していたが、蛋白尿はlogアポB-48比とのみ強く相関し、logアポB-48/TG比はeGFR低下の有意な規定因子である事が判明した。以上の事から、空腹時アポB-48濃度の基準値上限が判明し、今後のCM-R蓄積リスクを評価し得るようになり、またアポB-48濃度の上昇は心血管イベントのみではなく腎機能障害のリスクを増加させる事が判明した。

共同研究者

大阪大学保健センター 准教授 西田 誠
大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学講座 特任助教 増田大作
大阪大学医学部附属病院 臨床検査部 花田浩之、大久保学
東京慈恵会医科大学 臨床医学研究所 客員教授 多田紀夫
東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座 教授 吉田博
セントマーガレット病院 健康管理センター 新井俊彦

A. 研究目的

虚血性心疾患のリスクファクターである空腹時高TG血症の背景にTGリッチリポ蛋白(TRL、小腸由来のカイロミクロン[CM]および肝臓由来のVLDL)の増加が存在している。TRLがリポ蛋白リパーゼにより水解され形成されるレムナントのうち、食後高脂血症ではCM由来のカイロミクロンレムナント(CM-R)が食後に蓄積しているが、これは血管壁に直接浸潤し、マクロファージの泡沫化や血小板凝集能の促進作用を有し動脈硬化惹起性を有している。レムナントの評価にはレムナントコレステロール(RLP-C、RemL-C)測定がすでに確立されているが、CM-R単独での定量的評価が不可能であったため、我々は世界に先駆けてCM1粒子に1分子存在するアポB-48の測定系を開発した(ELISA法¹・CLEIA法²)。アポB-48濃度は食後高脂血症患者(IIb型高脂血症³やCD36欠損症⁴、やカイロミクロン蓄積を有する患者¹)で有意に高値をみとめた。また、空腹時アポB-48濃度は食後のTG値の推移と強く相関する食後高脂血症のマーカーであり⁵、空腹時TG値正常群(100<TG<150 mg/dl)において頸動脈内中膜複合体の肥厚度と相関する事を見だし⁶、さらにアポB-48/TGが家族性III型高脂血症の診断に有用であることを発見した⁷。さらに昨年度の検討では、冠動脈に有意狭窄を有する患者では空腹時アポB48値が有意に高値であり、この他のマーカーと比較して最も強く罹患率に相関し、さらに空腹時アポB-48の高値は他の動脈硬化性疾患リスク因子(高TG、低HDL-C、高HbA1c、低アディポネクチン血症)と重複するとより冠動脈疾患罹患率を有意に上昇させることが判明した⁸。以上のことから、CM-Rの蓄積を反映する空腹時アポB-48濃度は、動脈硬化惹起性を有するCM-Rの蓄積に強く相関することが判明した。

これまでの検討の対象は食後高脂血症や虚血性心疾患等既に進行した病態における検討が中心であり、これらの病態ではその平均値もすでに上昇している事が予想される。これに反して、健康診断等比較的病的な状態になる以前の病態における動脈硬化惹起性の判断のためのアポB-48濃度測定には、これらほとんど病的な異常を有さない集団における正常範囲(upper limitおよびreference interval)の決定が必須である。このことから、今回は検診受診者を対象として空腹時アポB-48濃度を検討する事とした。また近年、腎機能低下(chronic kidney disease, CKD)が注

目されており、その進行と動脈硬化性疾患の重症化が様々検討されている。このことから、CKDを有する患者群を中心として空腹時アポB-48濃度を測定し、これら患者におけるカイロミクロンレムナントの蓄積とCKD病態の悪化が相関を有するかどうかを検討した。

¹ J Lipid Res. 2003;44:1256-1262. ² Clin Chim Acta. 2012;413:160-165. ³ Eur J Clin Invest. 2009;39(8):689-98. ⁴ J Lipid Res, 2009;50(5):999-1011. ⁵ J Atheroscler Thromb. 2011;18:1062-70. ⁶ Atherosclerosis. 2011;218:226-32. ⁷ J Atheroscler. Thromb. 2012;19(9):862-71. ⁸ Eur J Clin Invest. 2012;42(9):992-9

(倫理面への配慮)

本研究の内容は大阪大学医学部附属病院、大阪大学保健センター、慈恵医大柏病院内の各IRBにて承認され、測定データ及び生体材料は匿名化され研究終了時に破棄された。被験者に不利益が生じた場合には同意撤回及び相談可能とした。

B. 研究方法

1. 健康な日本人における空腹時アポB-48濃度の基準範囲の決定

大阪大学医学部附属病院・大阪大学保健センター・慈恵医大柏病院・セントマーガレット病院に年1回の健康診断目的に受診した、なんらかの投薬のなされていない連続516症例を対象としすべてから文書にて試験内容に対する承諾を得た。BMI、ウェスト周囲径、血圧および空腹時LDL-C、中性脂肪(TG)、HDL-CおよびアポB-48濃度を測定した。アポB-48濃度は年齢・閉経前後・脂質代謝異常の有無(LDL-C ≥ 140 mg/dL, TG ≥ 150 mg/dL, HDL-C < 40 mg/dLのいずれか)、metabolic syndrome(MetS)の有無およびそれぞれのリスク因子数によって比較した。さらに、この検討の結果確認された、脂質代謝異常を有さない332例のアポB-48濃度の分布を平均値 ± 2.58 standard deviation(SD)を外れる値を除外することを繰り返してアポB-48濃度の基準値上限、基準範囲(平均 ± 1.96 SD)を決定した。

2. 空腹時アポB-48濃度とeGFR低下・蛋白尿増加の相関の検討

大阪大学医学部附属病院に通院中の264症例に対して包括同意による承諾を得て登録した。各患者のBMI、血圧、空腹時LDL-C、中性脂肪(TG)、HDL-CおよびアポB-48濃度を測定し、推定糸球体濾過量(

estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR)および定性的尿蛋白量(-,±,+,2+,3+)を測定した。eGFR高値群(>60 mL/min/1.73 m²)および低値群、尿蛋白陽性(≥1+)および陰性で4群に分け、高eGFR尿蛋白陰性群(n=50)、高eGFR尿蛋白陽性群(n=75)、低eGFR尿蛋白陰性群(n=74)および低eGFR尿蛋白陽性群(n=65)に分けた。この4群間で測定した項目を比較し、さらにMultiple regression analysisによりeGFRとこれらのいずれの項目が最も強く相関するかを検討した。

C. 研究結果

1. 健康な日本人における空腹時アポB-48濃度の基準範囲の決定

空腹時アポB-48濃度は男性で高値であり(3.8±3.3 μg/mL vs 2.4±1.9 μg/mL, p<0.001)(図1-1)、BMI25kg/m²以上(4.4±3.7 μg/mL vs 2.8±2.4 μg/mL, p<0.001)およびMetS患者(6.5±4.3 μg/mL vs 3.0±2.6 μg/mL, p<0.001)において有意に高値であった(図1-2)。さらにアポB-48濃度は脂質異常やMetSのリスク因子の増加に相関して上昇していた(図1-3)。さらに、脂質代謝異常を有さない332例を用いアポB-48濃度の平均値±2.58 standard deviation (SD)の除外を繰り返した結果、空腹時アポB-48濃度の基準値上限は5.7 μg/mL、平均値は2.04 μg/mL、平均±1.96SDの基準範囲は0.74-5.65 μg/mLと判明した。以上の結果から正常脂質代謝の者のCLEIA法による空腹時アポB-48濃度の基準値上限は5.7 μg/mLと推定された。

2. 空腹時アポB-48濃度とeGFR低下・蛋白尿増加の相関の検討

全体を尿蛋白陽性あるいは陰性、またはeGFR高値群と低値群に分けた場合のアポB-48濃度分布を図2に示す。尿蛋白陰性群よりも陽性群が、またeGFR低値群が高値群よりもアポB-48値は高値に分布していた(図2)。また、logアポB-48濃度およびlogアポB-48/TG比は高eGFR尿蛋白陽性群、低eGFR尿蛋白陰性群、低eGFR尿蛋白陽性群が高eGFR尿蛋白陰性群に比較して有意に高値であり、その相違は測定項目の中で最も強かった(表2-1)。さらに、検査項目ごとの相関の検討では、eGFRはlogアポB-48濃度とlogアポB-48/TG比と強く相関していたが、蛋白尿はlogアポB-48比とのみ強く相関していた(表2-2,2-3)。Multiple regression analysisによる検討ではlogアポB-48/TG比はeGFR低下の有意な規定因子である事が判明した。この結果

、eGFR低値および尿蛋白陽性は高apoB-48濃度の独立した規定因子である事が判明し、アポB-48濃度の上昇は心血管イベントのみではなく腎機能障害のリスクを増加させる事が判明した。

D. 考察

今回の検討では空腹時アポB-48濃度のスクリーニングにおける基準値の決定を目指して健常例における空腹時アポB-48濃度の分布を検討し、さらに近年動脈硬化性疾患の独立したリスクであるとする報告が集積しつつあるCKD患者における尿蛋白やeGFRの低下とアポB-48濃度の間に相関があるか否かについて検討した。

まず、基準値の検討では、4施設から516症例の登録を得た。従来の検討と同様に、空腹時アポB-48濃度の分布は男性および閉経後女性において高値であり、女性ホルモンのレムナント蓄積リスクの低下作用を示唆する結果であった。さらに脂質代謝以上や肥満、メタボリックシンドロームの存在はアポB-48濃度を上昇させるが、その異常リスクが1個でも存在するとアポB-48濃度上昇に影響を与えるため、正常値の検討には脂質代謝異常を有さない健常例(332例)を用いた。アポB-48濃度の平均値±2.58 standard deviation (SD)の除外を繰り返すことにより得られた結果は基準値上限は5.7 μg/mL(基準範囲;0.74-5.65 μg/mL)であった。昨年の検討では、冠動脈疾患罹患率でのアポB-48のcut-off値は4.34μg/ml(sensitivity, 0.82; 1-specificity, 0.33; predictive positive value, 79; predictive negative value, 61)であり、今回の基準値上限よりも低い結果であった。この事はアポB-48濃度の上昇で示されるCM-Rの蓄積は検診で正常に判断される集団においても認められており、冠動脈リスク評価に関して更なる評価項目の検討が必要である事が示唆された。現在、動脈硬化性疾患ガイドラインで示されている脂質異常の基準値上限ではこれらCM-Rの蓄積で表される潜在的な動脈硬化リスクを有する群のスクリーニングには不向きであり、今回のアポB-48濃度などより適切なスクリーニングマーカーの開発が急がれる。

さらに、今回はCKD患者に認められる蛋白尿の有無、eGFRの低下の有無とアポB-48濃度の有無との相関について検討した。CKD患者においてはeGFRの低下、尿蛋白の出現とともに動脈硬化性疾患の罹患やイベント発症が増加するが、この背景については十分な検討がなされていないのが現状である。CM-Rのクリアランスに

大きな影響を与えるのは小腸でのCMの産生、血管内皮でのLPLによる水解のほか、アポB-48の腎臓によるクリアランスが考えられている。図2に示すように尿蛋白陰性群よりも陽性群が、またeGFR低値群が高値群よりもアポB-48値は高値に分布しており、クリアランスの低下によるCM-Rの血管内蓄積を示唆する結果が得られた。またlogアポB-48濃度および動脈硬化惹起性により強く相関すると予想される比較的小粒子のレムナントの蓄積を反映するlogアポB-48/TG比は、eGFRの低下・尿蛋白の出現がいずれかでも存在すると高値となり、その両者の重複でより上昇する事が示された。Multiple regression analysisによる検討ではlogアポB-48/TG比はeGFR低下の有意な規定因子である事が判明しており、アポB-48濃度がeGFRの低下に強く影響を与えられている事が示唆された。このことはCKDによるeGFRの低下・クリアランスの低下はCM-Rの血管内への蓄積を招き、心血管イベントを増加させ、さらにeGFRを悪化させる事により悪循環を形成している事が示唆された。

E. 結論

脂質異常を有さない健常者における空腹時アポB-48濃度の基準値上限は5.7 µg/mL (基準範囲;0.74-5.65 µg/mL)であった。またアポB-48濃度はCKDにおいて認められるeGFRの低下・尿蛋白野出現により

増加し、さらにCKDの病態を進行させる事が判明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Masuda D, Nishida M, Arai T, Hanada H, Yoshida H, Yamauchi-Takahara K, Moriyama T, Tada N and Yamashita S. Reference Interval of Apolipoprotein B-48 Concentration in Healthy Japanese Individuals (J Atheroscler Thromb印刷中)
2. Okubo M, Hanada H, Matsui M, Hidaka Y, Masuda D and Yamashita S. Serum Apolipoprotein B-48 Levels Are Associated with Reduced Estimated Glomerular Filtration Rate and Increased Proteinuria (投稿中)

2. 学会発表

- European Atherosclerosis Society(H25)
- 日本循環器学会学術集会(H25)
- 日本動脈硬化学会学術集会(H25)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

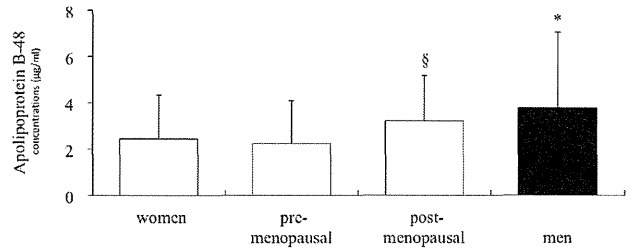
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

表1 参加者脂質・糖質代謝項目の結果

	Mean ± SD	Reference Interval
Men/Women	284/232	
Age (year)	42±10/42±11	
post-menopausal	48/232	
BMI (kg/m ²)	22.4 ± 3.3	22.0 - 22.7
Waist circ. (cm)	91.1 ± 5.6	90.0 - 92.2
sBP (mmHg)	115.9 ± 14.6	114.6 - 117.2
dBP (mmHg)	73.2 ± 11.3	72.2 - 74.2
TC (mg/dL)	199 ± 31	196.0 - 201.6
TG (mg/dL)	94 ± 69	87.7 - 99.7
HDL-C (mg/dL)	65 ± 15	63.1 - 65.9
LDL-C (mg/dL)	121 ± 29	118.1 - 123.3
FPG (mg/dL)	87 ± 13	86.2 - 88.5
HbA1c (FDS) (%)	5.0 ± 0.5	4.9 - 5.1

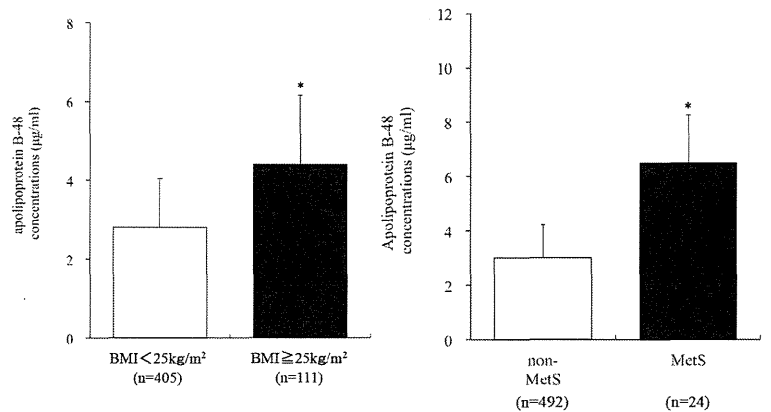
	Number of Patients
BMI ≥ 25 kg/m ²	111 (21.5 %)
BMI < 25 kg/m ²	405 (78.5 %)
Hypertension	47 (9.1 %)
high BP status	103 (20.0 %)
high FPG	10 (1.9 %)
Number of Abnormal Factors for Dyslipidemia	
0	337 (65.3 %)
1	138 (26.7 %)
2	37 (7.2 %)
3	4 (0.8 %)
Number of Risk Factors for Metabolic Syndrome (MetS)	
0	303 (58.7 %)
1	135 (26.2 %)
2	53 (10.3 %)
3	24 (4.6 %)
4	1 (0.2 %)

図1-1 性差と閉経前後の比較



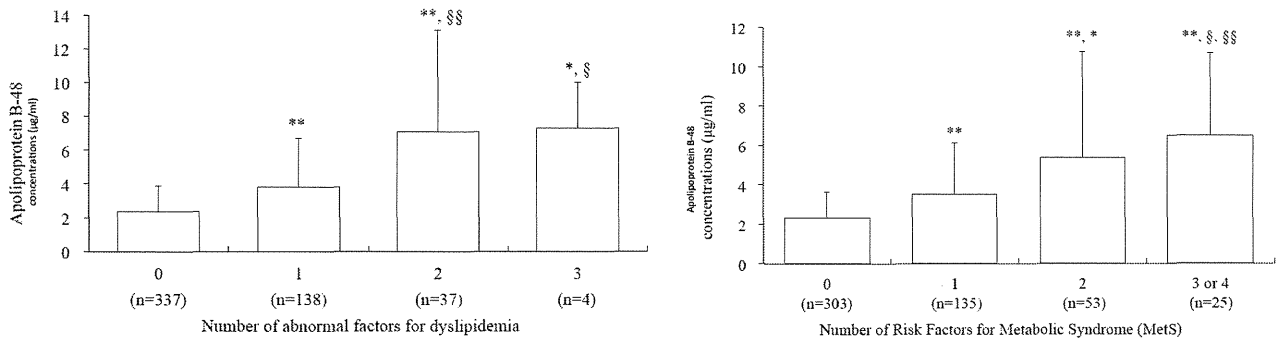
(* p<0.001 against women, § p<0.001 against pre-menopausal women, assessed by Mann-Whitney U test)

図1-2 BMI値・MetSとアポB-48濃度の関係



(* p<0.001 assessed by Mann-Whitney U test)

図1-3 脂質異常因子数・MetS 因子数とアポB-48濃度の分布



(* p<0.01, ** p<0.001 against cases with no abnormal factor, § p<0.05, §§ p<0.001 against cases with 1 abnormal factor, assessed by Mann-Whitney U test)

図2 尿蛋白の有無、eGFR 値と空腹時アポ B-48 濃度の分布

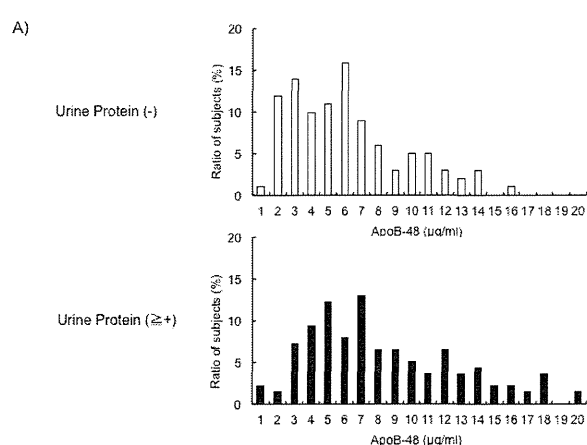


Fig.1 Okubo.et al.

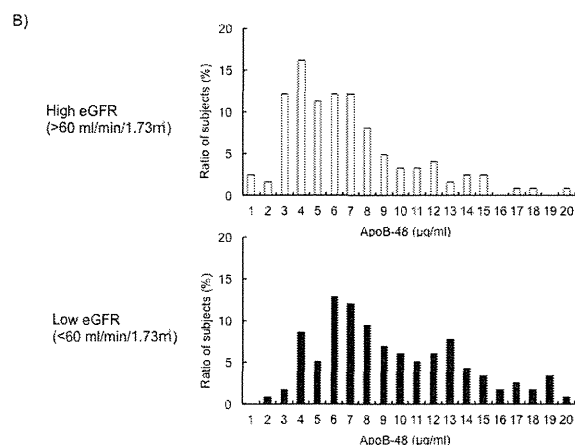


Fig.1 Okubo.et al.

表 2-1 eGFR 値および尿蛋白の有無と測定項目

	High eGFR (>60 ml/min/1.73m ²)		Low eGFR (<60 ml/min/1.73m ²)		p values ^a
	without proteinuria	With proteinuria	without proteinuria	with proteinuria	
Age (year)	60±15	61±17	65±12	63±13	0.215
Sex (m/f)	26/24	38/37	39/35	35/30	0.88
BMI (kg/m ²)	22±4	22±3	23±3	23±4	0.562
Diabetes (%)	16 (32)	27 (36)	21 (28)	24 (37)	0.581
Prevalence of drug-treated patients (%)	7 (14)	10 (14)	10 (14)	13 (20)	0.666
Systolic BP (mmHg)	123±24	122±18	122±21	136±23 ^{bc}	0.000
Diastolic BP (mmHg)	76±13	74±11	72±10	77±14	0.052
Prevalence of drug-treated patients (%)	10 (20)	26 (35)	30 (41)	43 (66) ^{cd}	0.000
eGFR (ml/min/1.73m ²)	80±18	79±16	36±16 ^e	34±17 ^e	0.000
UA (mg/dl)	5.3±1.2	5.3±1.5	6.8±1.3 ^{bc}	7.0±1.6 ^{bc}	0.000
Prevalence of drug-treated patients (%)	8 (16)	7 (9)	10 (14)	25 (38) ^{cd}	0.000
T-CHO (mg/dl)	194±42	205±58	296±47	265±70	0.648
Log-TG	2.0±0.2	2.2±0.2 ^b	2.1±0.2 ^b	2.1±0.2 ^b	0.000
HDL-C (mg/dl)	62±16	55±19	57±16	60±26	0.209
LDL-C (mg/dl)	109±44	121±49	114±41	117±48	0.495
Non-HDL-C (mg/dl)	133±40	150±55	139±33	145±63	0.301
Log-ApoB-48	0.57±0.28	0.74±0.29 ^b	0.78±0.32 ^b	0.89±0.26 ^{bc}	0.000
Log-ApoB-48/TG	0.28±0.13	0.35±0.13 ^b	0.35±0.16 ^b	0.41±0.11 ^{bc}	0.000

Data represent the means ± S.D. Comparisons between patients were divided into 4 groups based on eGFR and proteinuria. We divided all subjects ($n=220$) into low (<60 ml/min/1.73m²) and high (>60 ml/min/1.73m²) eGFR levels; these two groups were also divided according to without or with proteinuria (the dipstick). p values refer to results after analysis with adjustment for age, gender, and BMI. BMI, body mass index; BP, blood pressure; eGFR, estimated glomerular filtration rate; UA, uric acid; T-CHO, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high density lipoprotein-cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein-cholesterol.

^a p values for ANOVA test or χ^2 test.

^b Bonferroni's post-hoc analysis < 0.05 vs High eGFR without proteinuria.

^c Bonferroni's post-hoc analysis < 0.05 vs High eGFR with proteinuria.

^d Bonferroni's post-hoc analysis < 0.05 vs Low eGFR without proteinuria.

表 2-2 尿蛋白の有無と測定項目の相関

	Coefficient	Univariate <i>p</i> value
age	-0.1123	0.0826
BMI	-0.0195	0.7653
Systolic BP	-0.2034	0.0017
Diastolic BP	-0.1151	0.0782
eGFR	-0.0240	0.7057
T-CHO	0.0515	0.4262
Log-TG	0.2876	0.0000
HDL-C	-0.1475	0.0220
LDL-C	0.0954	0.1398
Non-HDL-C	0.0930	0.1502
Log-ApoB-48	0.2622	0.0000
Log-ApoB-48/TG	0.0876	0.1751

表2-3 eGFR値と測定項目の相関

	Coefficient	Univariate <i>p</i> value
age	-0.3938	0.0000
BMI	-0.1121	0.0843
Systolic BP	-0.1208	0.0646
Diastolic BP	-0.0223	0.7341
Urin protein	-0.0244	0.7057
T-CHO	0.0489	0.4498
Log-TG	-0.0218	0.7359
HDL-C	-0.0270	0.6764
LDL-C	-0.0106	0.8704
Non-HDL-C	-0.2693	0.0000
Log-ApoB-48	-0.3090	0.0000
Log-ApoB-48/TG	-0.3161	0.0000

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

小児 FH における動脈硬化進展の経時的変動について

分担研究者 太田孝男（琉球大学大学院医学研究科育成医学講座 教授）

研究要旨 近年、オランダから家族性高コレステロール血症 (FH) ヘテロ児の動脈硬化が 10 歳以降に急速に進展すること及びその進展がスタチン系薬剤の投与で阻止できることが報告されている。しかし、わが国での FH ヘテロ小児でのデータは報告されていない。本研究では 3 名の FH 児 (1 名は Compound Hetero, 2 名は兄妹で家族歴から診断した) の頸動脈内膜中膜厚 (IMT) の数年にわたる経時的変化を検討した。Compound Hetero 児ではスタチン治療により LDL-C の低下に伴い IMT の退縮が認められていたが 18 歳頃から IMT の肥厚が強まってきている。他の 2 名の FH ヘテロ児では初診時から今日まで脂質低下剤の服用無しでも IMT の増強は認められていない。症例数が限られているため結論は出せないが、一般的な FH ヘテロの場合男女共に少なくとも 22—23 歳頃までは著明な動脈硬化の進展は認められないようである。ただ、Compound Hetero 児のような著明な高 LDL-C 血症を呈する児ではスタチン投与でも思春期以降では完全に動脈硬化の進展を抑えるのは難しいようである。

A. 研究目的

家族性高コレステロール血症 (FH) は生直後より高 LDL-C 血症を呈し、無治療の場合患者の平均寿命は一般より 25-30 年短命であることが報告されている。その死亡原因の殆どは動脈硬化性心疾患である。今日、スタチン系薬剤や LDL アフェレーシス等の治療法の導入で FH 患者の生命予後は改善されつつある。しかし、成人においても FH の診断は未だに充分なされていない。動脈硬化性疾患は徐々に進行する慢性疾患であり、その発症予防には早期診断、早期治療が大切なことは明白である。動脈硬化の臨床症状出現前の小児期に FH を診断し、治療管理を開始すれば FH 患者の予後は飛躍的に改善されると思われる。日本人小児 FH の診断基準は動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012 年度版に収載され、小児科医への周知も始まっているが、治療法や治療開始時期の検討はまだ行われていない。欧米では、小児 FH の動脈硬化が 10 歳以降、急速に進展することが報告されている。またスタチン系薬剤の使用でその進展を阻止できることも明らかにされてい

る。今年度の研究では、昨年と同様に日本人 FH 児で LDL-C と動脈硬化の進展の関連を頸動脈内膜中膜厚 (IMT) の関連、及び経年的 IMT の変化を解析することを目的とする。

B. 研究方法

対象：琉球大学附属病院小児科フォロー中の 3 名の FH (compound hetero 1 名、ヘテロ男児 1 名 現在 19 歳、ヘテロ 2 名：兄 23 歳、妹 21 歳)。IMT の測定は日本超音波学会ガイドライン「超音波による頸動脈病変の標準的評価法」に準じて行った。7.5MHz リニアプローブを用いて、左右の総頸動脈及び内頸動脈での最大内膜中膜複合体厚 (Max IMT) を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は全て保護者の同意を得て行われている。

C&D. 研究結果と考察

LDL-C と IMT の関連

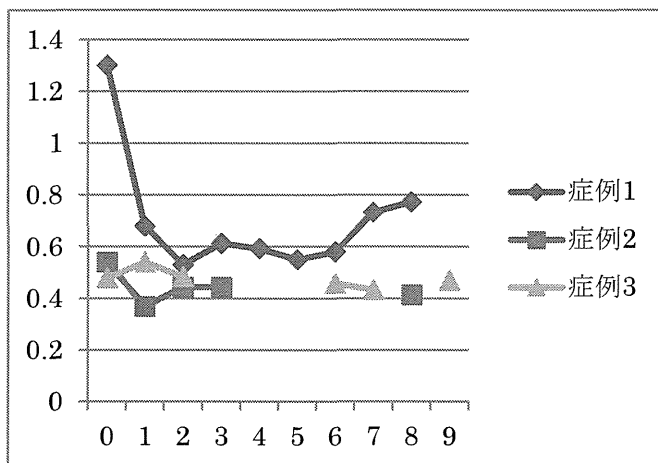
3 名の FH 患児のこれ迄の LDL-C と IMT には有意な

相関が認められた ($r=0.47$, $p=0.02$)。

HDL-C と IMT の相関

HDL-C は LDL-C と異なり負の相関が認められたが、その相関は LDL-C よりも強かった ($r=-0.762$, $p<0.01$)。

図 1. IMT の経時変化



9年間の IMT の変化を図に示す。症例 1 が compound hetero 男児、症例 2 が兄、症例 3 が妹である。昨年度の報告では症例 1 の IMT の変化は軽度であったが、その後 0.6mm から 0.8 mm へと IMT の肥厚が進行してきている。その間の LDL-C は 220-240mg/dL だった。初診時の LDL-C は 400mg/dL であり、IMT も 1.3 mm であった。いずれも初診時のレベルには達しておらず、スタチン系薬剤の効果は認められている。HDL-C に関しては初診時 30mg/DL 程度で低 HDL-C が認められたが、スタチン使用後もその値は 40mg/dL 台で増加の程度は弱いようである。今後、注意深い治療管理が必要な例である。兄妹例では兄は LDL-C が 150-180 mg/dL、妹は 200-230 mg/dL であり、妹にはゼチアを処方していたが、最近まで殆ど服用していなかった。兄には食事指導のみで投薬は行っていない。症例 1 より年長ではあるがこの兄妹では IMT の有意な変化は経過中認められなかった。

E. 結論

小児期でも IMT が LDL-C 及び HDL-C と相関する事は昨年度と今年度の研究で確認でき、20 歳前でも動脈硬化の進展が成人と同様に LDL や HDL の影響を受けていることが明確になった。症例 1 は LDL 受容体遺伝

子のエクソン 4-12 deletion と L547V の compound Heterozyote であり 11 歳時に FH と診断した。初診時に IMT で動脈硬化の進展が認めら、幸いにもスタチン製剤に反応が認められたので、ロスバスタチンとエゼチミブで治療を開始している (3D-CT で冠動脈の狭窄は認めれなかった)。薬剤治療開始 1 年で図に示す様に著明な IMT の改善が認められ (1.3 mm から 0.7 mm)、その後 0.5-0.6 mm 台でコントロールできていた。しかし、18 歳時点から 0.7mm-0.8mm と IMT の進展を認め始めている。その間の LDL-C は以前と大きな変化は認められていない。冠動脈の狭窄は 3D-CT で認められていない。IMT の値はそれほど大きくないが今後進展が進むようなら LDL apheresis の導入も検討する必要があると考えている。また、怠薬があった場合、LDL-C は 300mg/dL を超えるので、厳格な服薬指導を続けている。兄弟例は薬の服用がうまく行かず、食事及び生活指導のみで診ているが IMT の増強は殆ど認められていない。この結果から症例が少なく結論は出せないが、一般的な FH の場合は欧米と異なり、LDL-C 200mg/dL 前後では小児期での動脈硬化の進展はそれほど大きくないのかも知れない。ただ、ある時期から急速に進行する可能性もあり、注意深い観察が必要だと思われる。

最後に、小児期の FH 及び高 LDL-C 血症では IMT 等を利用して動脈硬化の進展を見ながら治療管理を行うことが必要だと思われる。動脈硬化が進展する場合に限っては、スタチン系薬剤の使用も考慮すべきであろう。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願、登録状況

該当なし。

平成25年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

家族性LCAT欠損症を対象とした遺伝子治療による酵素補充療法の開発

研究分担者 武城英明（東邦大学医療センター佐倉病院）

研究協力者 黒田正幸（千葉大学医学部附属病院）

研究要旨 原発性脂質異常症の1つ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、LCAT酵素の補充療法が根治療法と考えられるが、その疾患の希少性などにより開発が進んでいない。本研究は根本的治療法のない難治性血清蛋白欠損症である家族性LCAT欠損症に持続的蛋白補充に基づく新規治療法を実用化・提案することを目的とする。Ex vivo遺伝子治療法の標的細胞として、脂肪組織から天井培養法によって調製される前脂肪細胞を選択した。前脂肪細胞は、純度が高く、脂肪細胞への分化能を高度に維持した細胞であり、皮下脂肪組織への移植に適した細胞であることが示された。さらに治療遺伝子であるLCAT遺伝子を安定持続発現する細胞であり、そのレトロウイルスベクターによる遺伝子導入様式は安全性の高いものであることが示された。前脂肪細胞の産生するLCAT蛋白はLCAT欠損症患者血清において障害されているリポ蛋白代謝異常を改善し、LCAT欠損マウスモデルへの移植によりLCAT欠損マウスにおいても脂質異常を改善した。すなわち、異所性に前脂肪細胞が分泌するLCATが血中に補充されることによりLCAT欠損症の病態を改善することが示唆された。これらの研究成果を元に、遺伝子治療臨床研究の申請作業を進め、本年度5月に遺伝子治療臨床研究（課題名：家族性LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）欠損症を対象としたLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究）の実施承認を受けた。前脂肪細胞を用いた遺伝子細胞治療技術はさまざまな酵素欠損症の移植技術に有用であることが明らかになり、今後さまざまな酵素補充療法に応用する予定である。

A. 研究目的

私たちは、原発性脂質異常症の1つ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）欠損症に対して、これまで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ている。本研究で実用化を目指す遺伝子細胞移植技術に基づく持続的酵素補充療法は、患者皮下脂肪組織から採取した脂肪組織から増殖可能な前脂肪細胞を調製、それにレトロウイルスベクターで治療遺伝子を導入し、遺伝子導入前脂肪細胞を拡大培養した後に患者皮下脂肪組織に移植することで治療蛋白を血中に供給する治療法である（図1）。

本研究では、これまでの研究活動で入手したLCAT欠損症患者血清検体とLCAT欠損マウスを用い、その病態改善効果を検討し、根本的治療法がなく腎不全に至る家族性LCAT欠損症を対象として、世界で初めて実用化することを目的とする。

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4症例（千葉大、自治医大、北里大、大阪大）、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13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）5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。

2. LCAT遺伝子導入前脂肪細胞が分泌するLCATの患者HDLに対する改善効果

前脂肪細胞が分泌するLCAT酵素の機能を評価する目的で、健常人ドナーの脂肪組織から天井培養法により前脂肪細胞を調製し、レトロウイルスベクターによりLCAT遺伝子を導入、その培養上清を濃縮した。

LCAT欠損症患者血清と健常人血清のリポ蛋白分布の違いに着目し、患者血清に前脂肪細胞が分泌したLCAT蛋白を添加し、添加後のHDLの成熟の度合いを二次元電気泳動とHDLの主要アポリ蛋白であるApoAIに対するウェスタンブロット法を組み合わせ、患者血清中のHDL粒子の成熟を指標とした治療反応性評価を行った。腎機能障害を合併する家族性LCAT欠損症症例を含め、全ての患者血清において、ApoAI含有HDLが前脂肪細胞の産生するrLCATの添加により高分子側にシフトすること、すなわちHDLの成熟に機能することを確認した(図1)。少なくとも検討できた症例については、前脂肪細胞が分泌するLCAT蛋白は、患者血清中に補充された際には患者の病態を改善できることが示唆された。

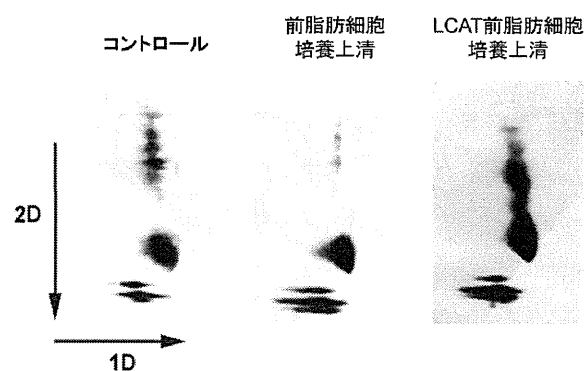


図1. LCAT遺伝子導入前脂肪細胞の培養上清による患者HDLの成熟

培養上清を添加インキュベーションした後、二次元電気泳動を行い、HDLの主要アポリ蛋白であるApoAIに対するウェスタンブロットを行った。

3. 患者血清リポ蛋白のサイズによる分画解析

2の結果からLCAT遺伝子導入前脂肪細胞の培養上清は患者HDLの成熟に機能することが明らかになった。LCAT欠損による最も重篤な合併症は腎不全であり、本遺伝子細胞治療開発の第一目標は腎不全への移行の阻止である。

以前より家族性LCAT欠損症の腎不全合併には異常LDLが関与することが報告されているが、個々の症例の検討にとどまっており、詳細は不明である。そこで、腎機能障害を合併しないFED症例と健常人を対照としてFLD症例のリポ蛋白異常を解析した(図1)。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FLDに特徴的なリポ蛋白異常として、フラクション11~16にFCとPLに富んだ不均一なサイズのリポ蛋白が認められた。FLD、FEDに共通して、すなわちLCAT欠損に共通してLDL分画のピークが9から8になっている、すなわちLDLの粒子サイズが健常人に比べて大きいことがわかった。

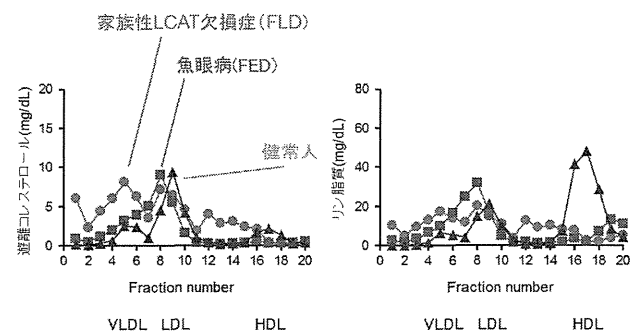


図1 FLD、FED、健常人のゲルろ過分画パターンの比較

分画後、それぞれのフラクションについて総コレステロール、トリグリセリド、遊離コレステロール、リン脂質の濃度を測定した。図には遊離コレステロール(左)とリン脂質(右)の結果を示した。

4. 家族性LCAT欠損症に認められるリポ蛋白異常

以上の結果を元に、FLD、FED、健常人において粒子サイズの大きな分画に図4のような相違が認められることが考えられた。

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(そ

れぞれVLDLとLDL)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にピークを持ち、それまでのフラクションにはっきりとしたピークが認められないこと、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。

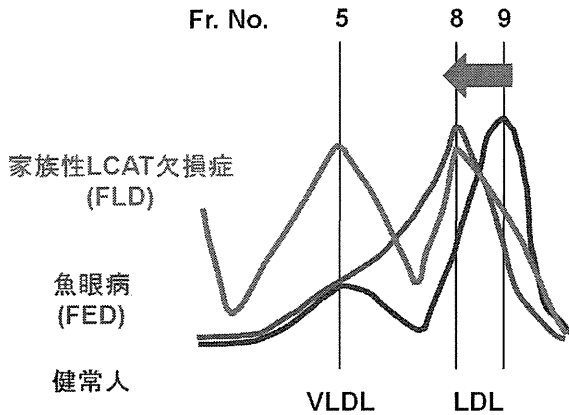


図4 FLD、FEDにおけるリポ蛋白サイズの異常
FLD、FED、健常人の解析より、健常人におけるVLDL、LDL分画付近について比較し、その傾向を図示した。

5. 家族性LCAT欠損症のリポ蛋白異常に対するLCATの影響

LCAT欠損症ではHDLの機能異常が認められる。前述の2の結果について同様のゲルろ過分画解析を実施した。FLD、FEDともに、LCAT遺伝子導入前脂肪細胞の培養上清の添加インキュベーションによりFCの減少とCEの増加が認められ、HDLの機能が改善することが示唆された。

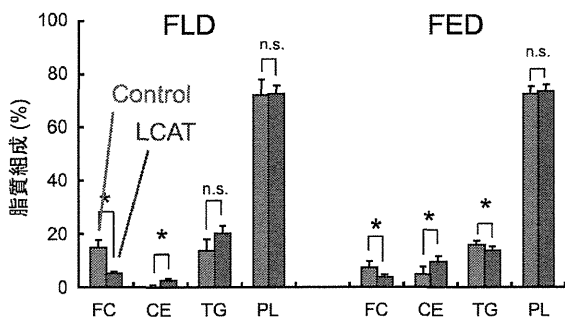


図5 rLCAT添加によるLCAT欠損症HDLの改善

次に、LCAT異常によりサイズ異常が生じ、腎不全でその量が変動するLDL分画についてその脂質組成をさらに検討した(図5)。

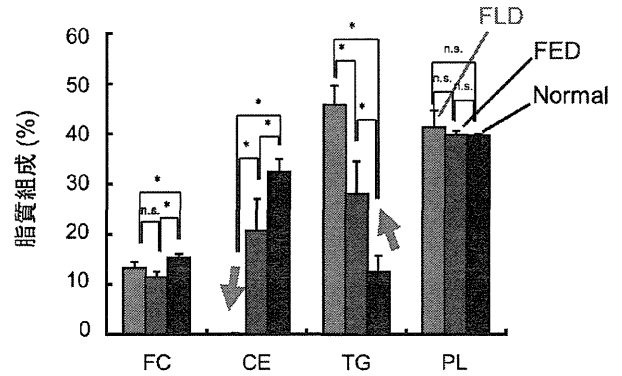


図5 FLD、FEDにおけるLDLの異常
FLD、FED、健常人の解析より、脂質組成を比較解析した。

その脂質組成はFLDではCEが低値であり、TGが高値であった。

このFLD、FEDの間で組成に違いの認められたLDLについてLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が産生・分泌するrLCATの反応性を評価した。その結果FLDのLDLではCEの出現とPLの減少が観察され、rLCATに反応したが、FEDのLDLはrLCAT添加に対して反応しなかった(図6)。

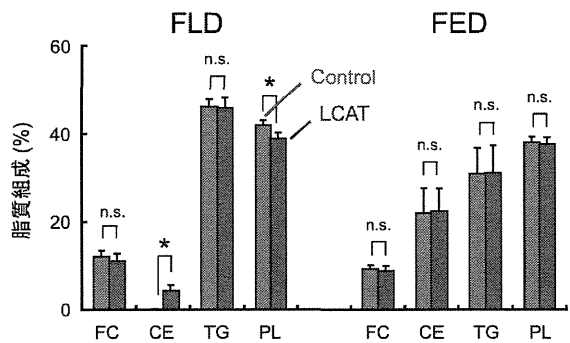


図6 FLD、FEDにおけるLDLのrLCATに対する反応性
FLD、FEDの血清にrLCATを添加反応させ、反応前後の脂質組成を比較した。

5. LCAT 欠損マウスでの有効性解析

作業委員会審査の過程において必要となったモデル動物での薬効解析を実施した。

名古屋市立大学・横山信治教授、群馬大学・佐藤幸市先生のご協力の下、LCAT 欠損モデルマウス(以下、KO マウス)を入手し、本解析に向けた繁殖を平成 22 年度 8 月より実施し、平成 23 年度から移植実験への使

用が可能となった。繁殖維持を繰り返しながら、薬効試験を実施した。

K0 マウスへの移植実験の結果、移植 7 日後までは、血中に hLCAT を検出したが、その後検出できなくなり、検討の結果 hLCAT に対する抗体の出現を確認した。そこで、免疫抑制剤（シクロフォスファミド）を併用する薬効試験を実施した。その結果、移植 7 日以降も、血中に LCAT 活性（コレステロールのエステル化活性）を検出した（図 7）。その活性はヒト ApoAI の存在下で活性化されることから、血中に検出された hLCAT は活性体としてマウス血中に分泌されていることが分かった。

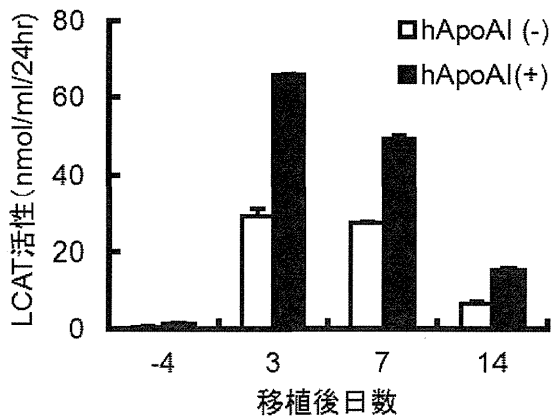


図 7 LCAT 欠損マウス血中へ分泌されたヒト LCAT の活性

移植 7 日後の血清検体についてリポ蛋白の分画解析を実施したところ、HDL 分画のコレステロールエステル比の上昇と LDL の脂質組成の改善を認め（図 8）、免疫排除機構を抑制した実験系において脂質代謝異常の改善を認めた。生理学的に LCAT を産生する臓器は肝臓であるが、以上の結果は、前脂肪細胞が異所性に産生する LCAT が、本研究が目的とする LCAT 欠損症の病態の改善に機能し得ることを示唆している。

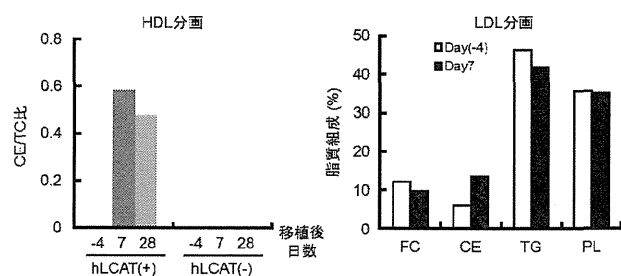


図 8 LCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞移植による LCAT

欠損マウスの脂質異常の改善

6. 遺伝子治療臨床研究の申請作業と実施承認

これらの有効性解析結果に加え、動物試験による安全性解析等の結果をまとめ、遺伝子治療臨床研究実施計画書を厚生労働省に申請し、H25 年 5 月 13 日付で遺伝子治療臨床研究の実施承認を受けた。

(倫理面への配慮)

移植細胞の薬効薬理および生着性に関する研究は、千葉大学大学院医学研究院の規定に従い、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則並びに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で実験許可を受けて実施した。

遺伝子治療臨床研究実施に向けて、「臨床研究に関する倫理指針」、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」及び「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく第一種使用規程を遵守し、また「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」および「その一部を改正する省令ならびにそれらの関連通知」に準拠研究を実施した。移植細胞の調製業務は、「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」、「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の製造管理・品質管理の考え方について」、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」に基づく「治験薬の製造管理及び品質管理基準および治験薬の製造施設の構造設備基準（治験薬 GMP）について」を満たす製造設備及び手順に遵守し実施した。

DおよびE. 考察および結論

LCAT 欠損症は酵素補充療法が有効と考えられるが、希少疾病であることに加え、様々な制約により、その治療法開発が進んでいなかった。

本研究で、家族性 LCAT 欠損症を対象とした遺伝子治療臨床研究の実施が可能となり、本遺伝子細胞治療が薬事承認を受ける第一歩を踏み出すことができた。今後は PMDA 薬事戦略相談等を利用し、より良い遺伝子細

胞治療の開発を目指す予定である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Shiba T, Bujo H, Takahashi M, Sato Y, Jiang M, Hori Y, Maeno T, Shirai K. Vitreous fluid and circulating levels of soluble lrl1, a novel marker for progression of diabetic retinopathy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2013; 251: 2689-2695.
- 2) Naito S, Kamata M, Furuya M, Hayashi M, Kuroda M, Bujo H, Kamata K. Amelioration of circulating lipoprotein profile and proteinuria in a patient with LCAT deficiency due to a novel mutation (Cys74Tyr) in the lid region of LCAT under a fat-restricted diet and ARB treatment. Atherosclerosis. 2013; 228: 193-197.

学会発表

- 1) Kuroda M, Aso M, Saito Y, and Bujo H. Self-transplantation using therapeutic-enzyme secreting adipocytes for familial LCAT deficiency syndrome. 第45回日本動脈硬化学会総会・学術集会シンポジウム. H25. 7. 18-19 (東京)
- 2) 黒田正幸、浅田咲世、青柳靖之、石橋俊、山下静也、鎌田貢壽、AG. Holleboom、武城英明. LCAT欠損症の腎不全に関わる異常リポ蛋白の同定と酵素添加による改善. 日本小児脂質研究会. H25. 11. 9-10

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

動脈硬化性疾患予防ガイドライン2012年版に対する意識調査

分担研究者 荒井 秀典（京都大学大学院医学研究科 教授）

研究要旨

各都道府県41会場において動脈硬化性疾患予防ガイドライン2012年版に対する認知度の調査を行った。計724名より回答を得、45.4%はLDLコレステロールを直接法により求めており、78.6%はCKDが高リスク病態に加わったことを知っており、72.2%が絶対リスクの導入について知っていた。Non HDLコレステロールについては40.1%がすでに診療で活用していると回答し、40.2%が今後活用したいと回答した。家族性高コレステロール血症の診断基準の変更に関しては30%が新しい診断基準のほうを使いやすいと回答した。従って、依然として家族性高コレステロール血症に対する認知度は低く、今後原発性高脂血症研究班及び日本動脈硬化学会においてさらなる啓発活動の必要背が感じられた。

A. 研究目的

動脈硬化性疾患予防ガイドライン普及啓発セミナーに参加した医師を対象としてガイドラインがどの程度周知されているかを明らかにする目的で、アンケート調査を実施した。

特に原発性高脂血症であり、今回のガイドラインで診断基準を改定した家族性高コレステロール血症（FH）に対する認知度を明らかにすることも目的とした。

B. 研究方法

ガイドラインについてのアンケート調査

2012年8月29日から2013年3月28日に開催されたガイドライン普及啓発セミナーの参加者に対して任意で自記式アンケート調査を実施した。アンケートの内容は日本動脈硬化学会広報委員会において作成した。

41会場。回答者数724名

（倫理面への配慮）

無記名によるアンケート方式とし、個人の識別ができないよう配慮した。

C. 研究結果

各セミナーにおける参加医師数が把握できていないため、回収率は明らかでないが、集計数724（男性、615、女性、80、不明12）、年齢は50歳代が最も多かった（36.6%）。まず、60.9%がガイドライン2007年版に基づく治療を行っており、81.4%が2012年版のことを知っていた。70.2%が多く脂質異常症患者の診療を行っていたが、45.4%はLDLコレステロールを直接法により求めていた（図1）。また、78.6%はCKDが高リスク病態に加わったことを知っており（図2）、72.2%が絶対リスクの導入について知っていた（図3）。Non HDLコレステロールについては40.1%がすでに診療で活用していると回答し、40.2%が今後活用したいと回答した（図4）。動脈硬化専門医については20.9%が取得したいと回答した。「家族性高コレステロール血症の診断基準が変更になりましたが、どうお考えですか？」

との質問に対しては30%が新しい診断基準のほうを使いやすいと回答した。しかしながら、約70%が診断基準を知らないと回答した（図5）。

D. 考察

アンケート回答者の属性は個人開業と病院勤務がほぼ半数ずつであったが、約25%の参加者が動脈硬化性疾患予防ガイドライン2012年版の内容を理解していた。また、LDLコレステロールの測定に関しては、LDLコレステロールの直接法を用いている医師が約半数いた。これは学会の声明が十分に伝わっていないためか、これまでの方法を変更したくないためか、いずれかによると思われた。

また、約30～40%の医師はすでにCKDが高リスク病態であることを認識し、non HDLコレステロールを日常診療で用いていることが明らかとなった。さらに、家族性高コレステロール血症の認知度は約30%と低かった。今後もさらなる啓発活動の必要性があると感じられた。さらに、このアンケート調査に関しては、属性と回答内容との関係についてさらに詳しい解析が必要と考えられた。

E. 結論

動脈硬化性疾患予防ガイドライン2012年版の普及啓発セミナーの参加者における新しいFHの診断基準の認知度は30%と低かった。冠動脈疾患のハイリスクであるFHの認知度を高めるようさらなる啓発活動が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yukutake T, Yamada M, Fukutani N, Nishiguchi S, Kayama H, Tanigawa T, Adachi D, Hotta T, Morino S, Tashiro Y, Arai H, Aoyama T, Arterial stiffness determined by cardio-ankle vascular index (CAVI) is associated with poor cognitive function in community-dwelling elderly, J Atheroscler Thromb, in press.
2. Arai H, Kokubo Y, Watanabe M, Sawamura T, Ito Y, Minagawa A, Okamura T, Miyamoto Y, Small Dense Low-Density Lipoproteins Cholesterol can Predict Incident Cardiovascular Disease in an Urban Japanese Cohort: The Suita Study, J Atheroscler Thromb, 20(2): 195-203, 2013.
3. Yamada M, Arai H, Takechi H, Aoya Global brain atrophy is associated with physical performance and the of falls in older adults with cognitive impairment, Geriatr Gerontol Int, 13(2): 437-42, 20

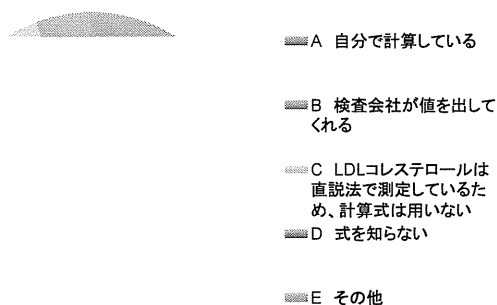
2. 学会発表

- 1) Arai H, (Symposium) Health Promotion and Disease Prevention for persons: Cardiometabolic health care older people in Japan, IAGG2013 (The IAGG World Congress Of Gerontology & Geriatrics), Jun. 23-27 2013, Korea.
- 2) Chair: Arai H, (Symposium) Quality of life In Older Adults In Japan and Brazil, IAGG2013 (The 20th IAGG World Congress Of Gerontology And Geriatrics), Jun. 23-27 2013, Korea.
- 3) 荒井秀典, 動脈硬化性疾患予防ガイドライン・治療ガイドのエッセンスー血清脂質評価の最新の考え方ー
- 4) シンポジウム「動脈硬化性疾患の予防および診療における脂質検査の現状と課題」, 第60回日本臨床検査医学会学術集会, 平成25年10月31日～11月3日, 神戸国際会議場 (兵庫) .
- 5) 荒井秀典, 山田実, 青山朋樹, サルコペニアおよびサルコペニア肥満は要介護と関連する, 第34回日本肥満学会, 2013年10月11日～12日, 東京国際フォーラム (東京) .
- 6) 荒井秀典, 糖尿病大血管症の予防・治療を目指した脂質管理のEBM, シンポジウム3「糖尿病大血管症の予防・治療を目指した新しい治療戦略」, 第28回糖尿病合併症学会, 2013年9月13日～14日旭川グランドホテル (北海道)

- 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

図1

LDLコレステロールはFriedewaldの式を用いて計算していますか？



動脈硬化性疾患予防ガイドライン2012年版において高リスク病態として慢性腎臓病(CKD)が加わったことをご存じですか？

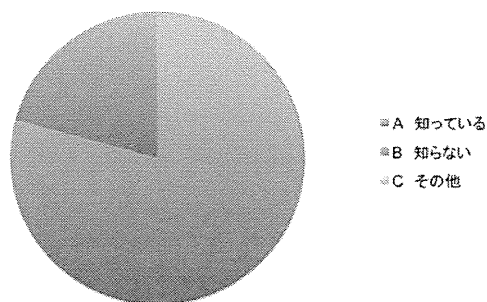


図3

動脈硬化性疾患予防ガイドライン2012年版においては高リスク病態を持たない脂質異常症患者のLDLコレステロールの管理目標値が絶対リスクにより決定されることをご存じでしたか？

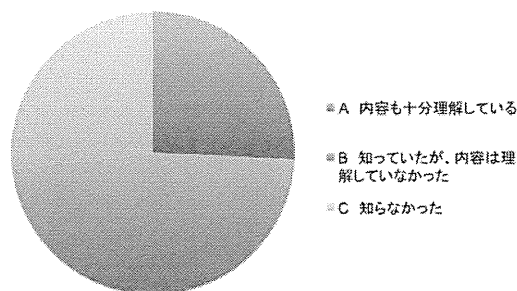
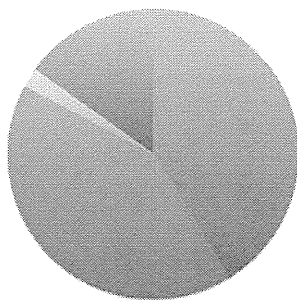


図4

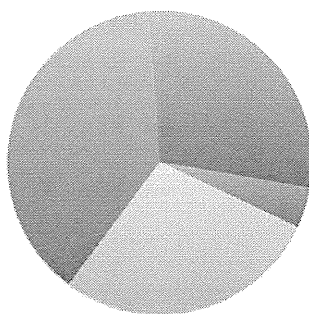
non HDLコレステロールを知っていましたか？



- A すでに診療で活用している
- B 知らなかったが、興味はある
- C 知らなかったし、使う予定もない
- D その他

図5

家族性高コレステロール血症の診断基準が変更になりましたが、どうお考えですか？



- A 旧診断基準より使いやすい
- B 旧診断基準のままでよい
- C 診断したことがないので、わからない
- D これから勉強して、診療に役立てたい
- E その他

分担研究者 野原 淳 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科脂質研究講座

研究協力者 川尻剛照, 岡崎智子, 馬淵 宏

研究要旨 家族性高コレステロール血症(FH)は常染色体優性遺伝疾患であり, 家族を含めた早期診断・早期治療が若年死予防に重要である. FHでは高LDL血症が主体である一方で高TG血症を伴う症例が少なくないが, その機序や影響は十分解明されていない. 我々は臨床的にFHヘテロと診断された940例で原因遺伝子変異の解析をおこない, 77%がLDL受容体遺伝子, 5%がPCSK9遺伝子の変異によるものであった. PCSK9遺伝子変異FHはLDL受容体遺伝子変異FHに比べ有意にTGが高値であるがLDL-Cは低値であったが, 血清脂質から原因遺伝子を推定することは困難であった. LDL受容体およびPCSK9変異未検出の100家系でアポB100遺伝子, さらにIDOL遺伝子を解析したが, FHの原因となる遺伝子変異は確認されず, 本邦におけるFHの原因としてアポB100およびIDOL遺伝子の関与は少ないであろうと考えられた. 冠疾患重症度に相関するとさえるアキレス腱肥厚(軟線撮影)をLDL受容体遺伝子変異が確定しているFH200例で検討したところ, 血清TGおよびapoB/LDL-C比と正相関を呈し, 高TG血症はFHの臨床像に少なくない影響があることが確認された. FHで腱黄色腫は必発ではなく, この場合家族性複合型高脂血症(FCHL)と診断される場合があるが, FCHL80家系で検討したところPCSK9変異は7.5%で一般人(1.7%)より有意に高頻度であった. FCHLはメタボリックシンドロームと明確な区別が困難な疾患であるが, 非FHとされる患者でもFH遺伝子変異を持つ症例が少なからず混在しており, 家族を含めた早期診断・早期治療に遺伝子解析が有用であると考えられた.

A. 研究目的

家族性高コレステロール血症(FH)は高LDL血症, 腱黄色腫, 早発性冠動脈硬化症を特徴とする常染色体優性遺伝性疾患である. FHでは高LDL血症が主体である一方で高TG血症を伴う症例が少なくなく, 冠動脈疾患発症を促進する可能性が示唆されているが, その原因や影響は十分解明されていない. 古典的FHはLDL受容体遺伝子変異により発症するもので, その遺伝的機序からはLDL代謝遅延がその主たる病態であることは明らかである. 近年の遺伝子解析の進展によりLDL受容体を分解しているPCSK9遺伝子異常が遺伝性高LDL血症の成因になることが示されてきている. 本邦では報告が無いが主に欧米においてLDL受容体のリガンドであるアポB100遺伝子変異が, FHとほぼ同様の臨床像をもたらす家族性欠陥アポB血症(FDB)となることが知られている. またPCSK9同様にLDL受容体の分解を制御しているIDOL(inducible degrader of the LDLR)がヒトにおいても重要な作用を持つことが証明されており, PCSK9同様に高コレステロール

血症をきたす可能性があることが示されている. 我々は多数の症例におけるFH症例遺伝子診断から本邦においてFH原因候補遺伝子変異がTG代謝に及ぼす影響について検討した.

B. 研究方法

臨床診断されたFHヘテロ接合体の940例において, High Resolution Melting (HRM)法およびMultiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法, 直接塩基配列決定法を用いて, FHの原因遺伝子であるLDL受容体遺伝子全エクソンの変異を検出し, PCSK9遺伝子において本邦で高頻度にFHの原因となることを確認したE32K変異の解析を行い, LDL受容体遺伝子変異例およびPCSK9遺伝子変異例, 変異が検出されない症例の臨床像の検討を行った. またLDL受容体遺伝子に疾患原性の遺伝子変異が確認されない100家系において, アポB100遺伝子およびIDOL遺伝子の解析を行った. アポB100の解析についてはこれまでFDBの報告が集中しているExon26の

直接塩基配列決定を行った。また IDOL 遺伝子の解析では全翻訳領域について HRM による解析を行った。また PCSK9 遺伝子 E32K 変異を FCHL80 家系で検討した。なお遺伝子解析は本学倫理委員会で承認されており、すべての患者から文書による同意を得たうえでやっている。

C. 研究結果

FH をきたす LDL 受容体変異が 732 例, PCSK9 変異が 56 例, LDL 受容体変異と PCSK9 変異の合併が 9 例, 変異が検出されなかったのは 143 例であった。なお LDL 受容体変異と PCSK9 変異の合併例は脂質値も高値の症例が多く臨床的にホモ接合体に近いと判断されるため、以降の解析からは除外した。

表 1

	LDLR mutations	PCSK9 mutation	Not detected	
Number	732	56	143	
Age (years)	62 ± 17	61 ± 18	68 ± 20	ns
BMI (kg/m ²)	24.0 ± 2	23.9 ± 3	23.9 ± 3	ns
T.Chol (mg/dl)	344 ± 71	280 ± 81	281 ± 59	<0.001
Triglycerides (mg/dl)	126 ± 94	150 ± 84	145 ± 74	<0.05*
HDL-C(mg/dl)	47 ± 15	51 ± 15	55 ± 27	<0.001
LDL-C(mg/dl)	268 ± 73	198 ± 82	198 ± 65	<0.001
F-Chol(mg/dl)	60 ± 9	74 ± 2	74 ± 2	<0.05
apoA1	122 ± 27	142 ± 28	139 ± 30	<0.01
apoAII	32 ± 7	35 ± 11	32 ± 6	ns
apoB	183 ± 51	130 ± 49	148 ± 42	<0.001
apoCII	4.3 ± 2	5.1 ± 2	5.7 ± 2	<0.001
apoCIII	10 ± 4	12 ± 5	11 ± 4	ns
apoE	6.3 ± 3	5.4 ± 1	5.5 ± 1	ns

* log-transformed

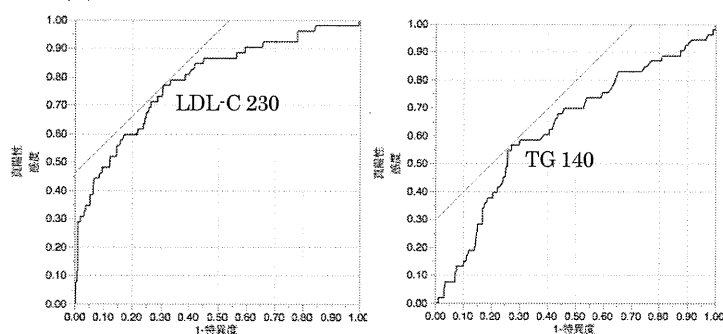
表 1 に未治療時の血清脂質値との関連を示す。LDL 受容体変異は PCSK9 変異および変異非検出例に比べ有意に LDL-C が高値であった。その一方 PCSK9 変異および変異非検出例においては TG が有意に高値であった。興味深いことに HDL-C は LDL 受容体変異および PCSK9 変異症例に比較し、変異非検出例においては有意に高値であった。

また軟線撮影によるアキレス腱肥厚は LDL 受容体変異で 13.6 ± 5 (mm), PCSK9 変異で 13.7 ± 4, 変異非検出例で 10.9 ± 3 で、臨床診断されている FH の中では変異非検出例で低値であった。

上記結果より血清脂質値から原因遺伝子が推定可能かどうかを ROC 解析から検討した。

図 1 に LDL 受容体変異と PCSK9 変異について PCSK9 変異を陽性として行った ROC 解析の結果を示す。LDL-C については LDL-C 230mg/dL で感度 77%, 特異度 46%であった。

図 1



TG については、臨床的血清 TG 値は有意に異なっていたが、ROC 解析では 140mg/dL で感度 57%, 特異度 30%で、血清脂質値から LDL 受容体変異か PCSK9 変異かの推定は容易ではないと思われる結果であった。血清脂質で LDL-C 230mg/dL 未満, TG 140mg/dL 以上の群における遺伝子異常検出率を見ると、LDL 受容体変異 30%, PCSK9 変異 15%, 変異未検出 55%となり、検出された変異では 30%が PCSK9 変異であったが、むしろ変異非検出例が多く含まれる集団であった。

変異非検出の 100 家系を対象に FDB の原因であるアポ B100 遺伝子 Exon26 を直接塩基配列決定法で変異検出を試みたが FDB の原因となる変異は検出されなかった。

さらにこの 100 家系において、PCSK9 類似の機序で高コレステロール血症をきたす可能性のある IDOL 遺伝子全翻訳領域を HRM 法にて検索したが、FH の原因となると考えられる変異は確認されなかった。IDOL 遺伝子では比較的高頻度に S342N 変異が検出された。同変異はコントロール群 150 人中 4 例でも検出され、軽度 LDL-C の上昇傾向 (141 ± 15 vs. 117 ± 32mg/dL, $p=0.06$) を認めたが、いずれにせよ FH の原因である可能性は非常に低いと判断された。なお S342N は白人では N の方が高頻度で野生型と登録されているが、S が本来の野生型と考えられ、血清脂質値の人種差の一部に寄与している可能性がある。

腱黄色腫は FH の最も特異的な身体所見であり、その程度は冠動脈硬化症の重症度とも相関があると報告されている。我々は (PCSK9 変異を除き) LDL 受容体遺伝子変異が確定しているヘテロ 200 例で軟線撮影によるアキレス腱肥厚の評価と寄与因子を検討した。(図 2)

結果 TG およびアポ B/LDL-C 比はアキレス腱肥厚と有意の正相関を認めた。また HDL-C は有意の負の相関を認めた。