

平成 25 年度厚生労働科学研究研究費補助金

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

(総合) 研究報告書

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

高頻度みられるアポ蛋白 A- G185C 変異の意味

分担研究者：	白井厚治	東邦大学医療センター佐倉病院、血管機能学 (寄付)
研究協力者：	永山大二	同 内科学講座
	龍野一郎	同 内科学講座
	村野武義、	同 研究開発部
	武城英明	同 臨床検査医学研究室

研究要旨

背景と目的：高中性脂肪血症は高度になると急性膵炎を発症し、まれに死に至る例がある。高度高中性脂肪血症の原因として、従来、血中中性脂肪 (TG) 分解酵素であるリポ蛋白リパーゼ (LPL) を中心に検索されてきたが、LPL 遺伝子や反応異常が見いだせない例、また L P L 活性化因子アポ C についても異常が見いだせない例が多くみられ、原因特定はまだ充分とは言えない。近年、海外では、新たに GPIHBP1、Lmf1、Angiopoietin like-3(Angptl3)、またアポ蛋白 A-V 異常が指摘されている。

本研究班では、これらについて日本人での実態を明らかにするため、1 . 高度高中性脂肪血症例 (TG>1000mg / dl) 69 例、うち急性膵炎発症例 12 例) を対象に分析を行った。その結果を踏まえ、さらに、2、頻度が高かったアポ蛋白 A- 遺伝子変異については症例を増やし 104 例さらに健常例も含めて検索した。

結果：研究 1：LPL 異常型 (LPL 欠損型、機能低下型、発現低下型) 25 例中、変異は計 6 例 (Ex5.D204E 1 例 ex4 G215R 1 例及び Ex9.S447X 4 例) 認められた。既知の GPIHBP1 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。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。しかし、アポ A-V 遺伝子異常は、5 種類の変異のうち G185C 保有例が認められ、53.3%と、明らかに高頻度みとめられた。

研究 2 . 高度高中性脂肪血症例 104 例について、アポ蛋白 A- 遺伝子 G185C 保有を中心に分析を行った。対照健常人 (血清 TG 値 150 mg / dl 以下例) では、2 . 3 %であったが、高度高中性脂肪血症例では、高頻度 58.7%に認められた。

考察：、通常、高中性脂肪血症は、肥満、糖尿病、アルコール飲酒で見られる。また、妊婦において高度高中性脂肪血症がみられることがあり、急性膵炎発症例もある。今後、日本人で特異的にみられたこのアポ蛋白 A- G185C の高度高中性脂肪血症における広範な実態調査、特に妊婦において、急性膵炎予防の観点から、実態調査を開始する必要がある。また、本遺伝子異常 (A- G185C) 蛋白が高度高中性脂肪血症をおこす機序については、まだ十分解明されておらず、治療を見据えた原因分析が必要である。

研究分担者氏名：白井厚治

所属機関：東邦大学医療センター佐倉病院、

血管機能学（寄付）

職位；客員教授、

A. 研究目的

高中性脂肪血症（高 TG 血症）は、高度な場合（5000mg/dl 以上）しばしば急性膵炎を発症し、腹膜炎から時に致死的な場合がある。主に、肥満、アルコール摂取、糖尿病が原因として上げられるが、妊婦でも、まれながらこの高度高 TG 血症が認められる。原因として、通常過食による TG の合成亢進に加え、その背景には血中の 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てきた。しかし、実際に高度高 TG 血症例の LPL について調べてみると、これまで知られている LPL の遺伝子異常、蛋白異常が特定できない例もしばしば認められる。近年、血管新生因子と考えられていた Angiopoietin like-3 (Angptl3) TG 血症発症への関与が指摘、また、LPL の血管内皮細胞表面への係留に関連する 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) の遺伝子異常が報告されている。

そこで、本研究班では、2011 年、69 例の高度高 TG 血症 (>1000mg/dl) 例で、上記、異常についての検索を行った（研究 1）。その結果を踏まえ、研究 2 では、更に症例を増やし、研究 1 で顕著であったアポ蛋白 A-1 (アポ A-1) の遺伝子、G185C 型の頻度について、健常人での頻度も合わせ検討した。

B. 研究方法

研究 1

対象；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 (TG>1000mg/dl) 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) を用いた。急性膵炎併発が 69 例中 12 例 (17.4%) に認められた。

方法：

LPL 蛋白量

ヘパリン 30 単位/kg 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、1MNaCl 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。

GPIHBP1 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 GPIHBP1 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。

血清 Angptl3 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。

アポ蛋白 A-1 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 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。

研究2

対象者：当院および他院より解析依頼のあった高度高TG血症104例（年齢は0～76歳。男性66例、女性38例、平均年齢 43.9 ± 18.0 歳）（表1）を用いた。

なお今回の対象例にて急性膵炎併発が19例（18.3%）認められた。健常対照者は、血清TG値 $<150\text{mg/dl}$ 例44例。

本研究は、東邦大学医学部倫理委員会にて承認を受け実施した。

方法：

研究と同様。

C. 研究結果

研究1

1) 高度高TG血症におけるヘパリン静注後LPL蛋白量と活性

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 $:50\sim150$ 、LPL活性 $:2.0\sim4.0$ ）、正常型（LPLmass >150 、LPL活性 >4.0 ）の4群に分類した。

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、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（表1）。尚、G215R変異は今までに未報告の遺伝子変異であった。

2) GPIIbP1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GPIIbP1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) 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) Angpt13蛋白量定量

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、 $414.4 \pm 257.0\text{ng/ml}$ とTG150mg/dl未満の正脂血症群 $269.7 \pm 87.1\text{ng/ml}$ に比して有意な高値を認めた（図2）。

5) アポA-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、高度抗中性脂肪血症の中で53.3%と、明らかな高頻度であった。

研究2

1) 高度高TG血症例の臨床背景（表2, 3）

対象は、当院、および精査依頼を受けた高度高TG血症（ $>1000\text{mg/dl}$ ）患者104名で、男性66名、女性38名。糖尿病合併例47.1%。肥満合併（BMI $>25\text{kg/m}^2$ ）48.1%。急性膵炎発症例は18.3%にみられた。なお健常対照は、血清TG150mg/dl以下、糖尿病、肥満のない例44名。

高度高TG血症の血清脂質値を表3に示した。平均TG値2029mg/dl。アポ蛋白では、アポC、C、Eとも高値であった。

2) 結果

アポA-遺伝子異常頻度

アポA遺伝子異常について検索したところ、今回検索した5種類の変異のうちヘテロ型、ホモ型は、G185C保有例のみが認められ、ヘテロ型46.2%、ホモ型12.5%であった。（表4）

正脂血症例ではG185Cのヘテロ型、ホモ型は、2.3%しか認められず、高度高TG血症例にて有意に高頻度であった（ $p<0.05$ ）（表5）。

アポA-遺伝子G185Cのヘテロ、ホモ型と血清脂質、アポ蛋白値の関係（表6）

アポA-遺伝子G185Cのヘテロ、ホモ型と血清脂質の関係をみると、高度高TG血症患者のなかでは、TG値、総コレステロール値、HDL-コレステロール値に差は見られず、また、アポ蛋白C、C、アポEも3群間に差を認めなかった。

糖尿病、肥満も3群間では、ややホモ型で高頻度を認めた。アポA Vは、ヘテロ型でやや低下傾向を認め

た。

D 考察

研究 では、高度高 TG 血症 69 例で、LPL 遺伝子異常の頻度は 69 例中 8 例 (11.6%) であった。LPL 以外の要因としてアポ A 遺伝子異常、GPIHBP1 遺伝子異常と Lmf1 遺伝子異常について、検討したところ、GPIHBP1 遺伝子異常と Lmf1 遺伝子異常は認められなかったが、アポ A では検索した 5 種類の変異のうち G185C 保有例のみが認められた。そこで研究 では、高度高 TG 血症の対象を 104 例に増やし、アポ A V G185C 変異を中心に、健常対照も合わせ検討した、

その結果、アポ A V G185C は、研究 と同様、高度高 TG 血症では、ヘテロ、ホモ型は合わせて、58.7% の頻度でみられた (1)。

一方、血清 TG 値 150mg/dl 以下の脂質正常群では 2.9% みられた。以上から、アポ A V G185C 変異は、高度高 TG 血症群で明らかに高頻度であり、日本人高度高 TG 血症でみられた特異的な所見と思われる。

アポ A の血清脂質代謝への影響とそのメカニズムについては、まだ明らかでなく、様々な説がある。

アポ A V ノックマウスでは、高 TG 血症が生じること (2) 一方、TG rich-lipoprotein の heparan sulfate proteoglycan との結合に關与し、レムナントの組織への取り込みに關与するとの報告もある (3)。

後者では、LDL-レセプターファミリーの中でも、LRP1、SorLA/LR11 への親和性があり、さらに sortilin への親和性があり、これらを介して、TG rich-lipoprotein の取り込みに關与しているとの説もある (4)。

アポ A V G185C 変異について、血清脂質レベルをみると、野生型、ヘテロ型、ホモ型間では、特に相異はなかった。血清アポ A の濃度が、ヘテロ型でやや低下していたが、ホモ型でより顕著な現象は見られず、濃度に依存するとは思われなかった。また臨床背景の導尿管、肥満の頻度は、ヘテロ型でやや低い傾向をみたが顕著でなく、体質的な原因に加えて、糖尿病、肥満が増悪要因になっていると思われる。

以上から、一般に高度高中性脂肪血症の主な原因は、肥満、糖尿病、アルコール摂取であるが、遺伝子変異の中では、アポ A- 遺伝子 G185C が半数以上にみられ

たことは、日本人の高度高 TG 血症の重要な原因遺伝子異常と考えられる。今後、しばしばみられる乳児、及び妊婦での高度高 TG 血症における意味など、広範な疫学的調査が必要と思われる。またそのメカニズムの検討も必要と思われる。

E 結論

日本人高度高 TG 血症例では、アポ A G185C 変異が主要な要員である可能性が示唆された。今後、さらに広範な調査、特に乳児、妊婦での検討が必要と思われる。

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

引用文献

- 1 . 白井厚治、永山大二、大平征宏、村野武義
日本人における高度高中性脂肪血症 (肺炎合併例を含む) 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 . 2011 年度厚生労働省「原発性高脂血症」班会議報告
- 2 . Fruchart-Najib J, Baugé E, Niculescu LS, et al.
Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;319:397-404.
- 3 . Merkel M, Loeffler B, Kluger M, et al. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 2005;280:21553-21560.
- 4 . Stefan K, Nilsson[‡], Stine Christensen et al ,
Endocytosis of Apolipoprotein A-V by Members of the Low Density Lipoprotein Receptor and the Vps10p Domain Receptor Families* *J Biol Chemistry*, 2008, 283,38, 25920-25927

表1 高度高TG血症のLPL遺伝子変異

The categorized the LPL abnormality	n	LPL gene analysis	
		Mutant case	Kind of mutations
Protein deficiency type	7 (10.1%)	3	Ex9. S447X: 3
Functional deficiency type	5 (7.2%)	2	Ex5. D204E: 1 Ex5. G215R: 1
Expression decreasing type	13 (18.8%)	1	Ex9. S447X: 1
Normal type	44 (63.8%)	2	Ex9. S447X: 2
Total	69 (100%)	8	Ex5. D204E: 1 Ex5. G215R: 1 Ex9. S447X: 6

表4 Incidence of ApoA-V mutation in severe hypertriglyceridemia

	S19W	Q139X	Q145X	V153M	G185C
Wild type (%)	100	100	100	100	41.3
Heterozygote (%)	0	0	0	0	46.2
Homozygote (%)	0	0	0	0	12.5

表2 高度高TG血症患者の臨床背景 (n=104)

年齢	43.9±18.0 歳
性別	男性66例、女性38例
糖尿病 [*] 合併頻度	49例 (47.1%)
肥満 ^{**} 合併頻度	50例 (48.1%)
BMI	25.4±4.1 kg/m ²
急性膵炎発症例	19例 (18.3%)

表5 Comparison of incidence of G185C mutation in patients and normal control

	TG<150 mg/dl n=44	TG>1000 mg/dl n=104
Wild type (%)	97.7	41.3 *
Heterozygote or Homozygote (%)	2.3	58.7 *

* P<0.05 vs TG<150

表3 高度高TG血症患者の脂質値 (n=104)

T-CHO (mg/dl)	349.6±172.9	LPL [*] mass (pre) (ng/ml)	39.6±20.9 (45~60)
TG (mg/dl)	2029.6±1581.1	LPL mass (post) (ng/ml)	187.0±109.4 (150~250)
HDL-C (mg/dl)	32.4±10.6	LPL activity (μmol/l/37°C)	6.37±4.02 (3~8)
ApoC-II (mg/dl)	17.9±7.3 (1.5~3.8)	HL ^{**} activity (μmol/l/37°C)	4.86±2.72 (4~10)
ApoC-III (mg/dl)	42.8±21.0 (5.4~9.0)		
ApoE (mg/dl)	18.3±11.1 (2.8~4.3)		

表6 Laboratory data in apoA-V gene mutation G185C

	Wildtype	heterozygote	homozygote
n	43	48	13
Age	43.7±19.2	37.6±19.5	47.0±13.6
BMI	25.3±4.1	25.0±4.4	26.9±2.2
Total Cholesterol	356.5±157.8	352.6±198.3	316.7±117.9
Triglyceride	1952.0±1127.2	2161.6±2006.1	1796.6±1011.1
HDL-C	32.2±10.1	32.4±11.3	32.7±10.3
Apolipoprotein C-II	17.2±8.6	18.3±6.9	19.2±3.6
Apolipoprotein C-III	40.4±22.1	44.6±21.9	43.5±15.5
Apolipoprotein E	17.7±10.3	18.6±11.3	18.8±14.1
Apolipoprotein A-V	1192.8±1090.8	601.8±689.7	937.7±756.1
Diabete%	48.9	43.8	53.8
obesity %	50.0	41.3	66.7
Acute pancreatitis %	20.9	20.0	7.7