

学位論文題名

Cholesteryl ester transfer protein gene: two common mutations and their effect on plasma high-density lipoprotein content

(コレステリルエステル転送蛋白の2つの遺伝子変異のHDLコレステロールに及ぼす効果)

学位論文内容の要旨

I 緒言

疫学的研究により血中HDL(high density lipoprotein: 高比重リポ蛋白)コレステロール濃度と虚血性心疾患の発症との間には負の相関が示唆されている。コレステリルエステル転送蛋白(cholesteryl ester transfer protein: CETP)は、HDL中のコレステリルエステルをトリグリセリドの豊富なりポ蛋白へ転送し、交換にトリグリセリドをHDLへ転送することで血中HDLコレステロール濃度を制御している。1984年、Saitoにより著しい高HDL血症患者2例(163, 181 mg/dl)を含む高HDL血症家系が報告された。これが家族性高HDL血症ホモ接合体の最初の報告である。1985年に、Koizumiらは、ホモ接合体2例で、CETP活性の欠損を初めて観察した。1990年に、Inazuらは、米国のグループと共同で、本例の遺伝子解析の結果、発端者は、CETP遺伝子のイントロン14のスプライスドナーの点変異(I14A)によりCETPの完全欠損を呈していることを見出した。同時期にYamashitaらも同様の報告をしている。その後、2種類のCETP遺伝子変異、1) エクソン15のアスパラギン酸からグリシンへのミスセンス変異(D442G)、2) エクソン10のグルタミンから終止コドンへのナンセンス変異(Q309X)が日本人により同定された。今回著者らはこのうちのI14AとD442Gの日本人における頻度と血中HDL-C濃度に及ぼす効果について検討した。

II 実験方法

1. 対象

血清HDL-コレステロール濃度40 mg/dl 以上を呈する226例(男120例、女106例、年齢23-88歳)の末梢血よりDNAを抽出した。なお脂質代謝に効果を及ぼす薬剤等の投与を受けている者は除外した。さらに成人病検診受診者6900名(男4902名、女1998名、年齢30-72歳)についてHDLコレステロール濃度の分布を検討した。

2. DNA 解析

I14Aを検出するためにプライマー(F-14AとR-14A)を、D442Gを検出するためにプライマー(F-D442GとR-D442G)を用いてpolymerase chain reaction(PCR)にて増幅した。なおI14Aの変異があれば制限酵素 Nde I で、D442Gの変異があればMsp Iで認識されるようにR-14AとF-D442Gには一塩基置換を挿入した。この増幅産物を各制限酵素で消化した後3% Nu-Sieve GTG アガロースゲルで電気泳動、染色し各バンドパターンより判定した。

3. CETP 活性測定

CETP 活性測定はAlbers の変法によった. すなわち, ドナーには ^{14}C -cholesteryl ester で標識した正常HDLを用い, アクセプターには正常LDL(low density lipoprotein: 低比重リポ蛋白)を用いて, これに被検血清を添加してコレステリルエステルの転送をおこなわせ, 沈殿分画法により分離したHDL中の残存放射活性を測定することによりCETP活性を測定した.

4. 血清脂質測定

総コレステロールとトリグリセリドは酵素法, HDLコレステロールはリンタンゲステン酸/デキストラン硫酸/マグネシウム法によりHDLを他のリポ蛋白より分離し, 酵素法にて測定した. LDLコレステロールはFreidewaldの式よりもとめた.

5. 統計学的解析

変異を有する者と正常者間のHDLコレステロール値とCETP活性の比較はMann-Whitney Uテストを用いた.

III 結果

226 例中44例(17.2%)に, I14AまたはD442Gのいずれかの変異を認めた. そのうち, I14A15例(ホモ接合体: 5例, ヘテロ接合体: 10例)はHDLコレステロール 80 mg/dl 以上を示し, 特にホモ接合体の全例においてHDLコレステロール 120 mg/dl 以上を示した. 一方, D442G 33例(ホモ接合体: 2例, ヘテロ接合体: 31例)では HDLコレステロール 50 mg/dl 以上であった. なお, D442Gヘテロ接合体のうち4例は複合ヘテロ接合体(I14A/D442G)であり, この4例ではHDLコレステロールは110 mg/dl 以上を呈した. これらの変異のHDLコレステロールのmean±SD値は, I14Aホモ接合体 150 ± 35 mg/dl, I14Aヘテロ接合体 97 ± 11 mg/dl, D442Gホモ接合体 $80-83$ mg/dl, D442Gヘテロ接合体 77 ± 11 mg/dl及び複合ヘテロ接合体 121 ± 4 mg/dlであった. HDLコレステロール濃度に対する変異頻度分布を検討したところI14AはHDLコレステロール80-89 mg/dlで1.1%, 90-99 mg/dlで6.8%, 100-109 mg/dlで16.7%, 110-119 mg/dlで37.5% および120 mg/dl以上で85.7%とHDLコレステロール上昇に伴って増加した. 一方, D442GはHDLコレステロール70-79 mg/dlと110 mg/dl以上の2峰性を示した. しかし後者は全て複合ヘテロ接合体であった. 6900名のHDLコレステロールの分布と上記の変異頻度分布より日本人の一般人口における各々の変異頻度を求めるとI14Aは0.81%, D442Gは4.62%であった.

CETP活性はI14Aホモ接合体で完全, 複合ヘテロ接合体でほぼ完全, I14Aヘテロ接合体とD442Gホモ接合体で中等度, D442Gヘテロ接合体で軽度の欠損を示した.

IV 考察

I14Aにおける高HDLコレステロールの機序はこの変異により生じる不全蛋白が細胞内で異常プロセッシングを受け, 活性のあるCETPが全く分泌されないためと考えられている. I14Aに関する我々の成績はこれまでの報告と類似した結果を示した. 一方 D442Gに関する報告はなく, この研究が初めてのものである. D442Gではホモとヘテロ接合体との間でHDLコレステロールに差を認めなかったが, これは変異CETPの正常CETPに対する dominant negative activity によるものと考えられている. 実験結果から明らかのように, I14AがHDL-C上昇に強力な効果を示すのに対し, D442Gは軽度のHDL-C上昇に参与している. しかし, 日本人における変異頻度はD442GがI14Aの約6倍を示し, この2つの変異頻

度を合わせると5.43%となり、日本人の約20人に1人は変異を有していることになる。このことより、日本人におけるHDL-C上昇にはCETP遺伝子の変異が強く関与していると考えられた。

V結語

以上の知見より、D442GはI14Aよりもcommonな変異であり、I14AはHDL-Cの上昇に強力な効果を、D442Gは軽度の効果を及ぼすことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 葛 卷 暹
副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

Cholesteryl ester transfer protein gene: two common mutations and their effect on plasma high-density lipoprotein content

(コレステリルエステル転送蛋白の2つの遺伝子変異のHDLコレステロールに及ぼす効果)

疫学的研究により血中HDL(high density lipoprotein: 高比重リポ蛋白)cholesterol(HDL-C)濃度と虚血性心疾患の発症との間には負の相関が示唆されている。Cholesteryl ester transfer protein(CETP)は、HDL中のcholesteryl esterをtriglycerideの豊富なりポ蛋白へ転送し、交換にtriglycerideをHDLへ転送することで血中HDL-C濃度を制御している。家族性高HDL血症はわが国で始めて発見された疾患で、CETP活性の欠損に起因する。1990年にInazuらにより本症がCETP遺伝子のintron14のsplice donor siteの点変異(I14A)によるCETPの完全欠損であることを見出した。その後、2種類のCETP遺伝子変異、1) exon15のミスセンス変異(D442G)、2) exon10のglutamineから終止コドンへのナンセンス変異(Q309X)が日本人により同定された。この3種類の変異のうち、Q309Xは非常に稀な変異であるので、I14AとD442Gについて日本人における頻度と血中HDL-cholesterol(HDL-C)濃度に及ぼす効果について検討した。

[対象] 血清HDL-C濃度40 mg/dl 以上を呈する226例(男120例, 女106例, 年齢23-88歳)の抹消血よりDNAを抽出した。なお脂質代謝に効果を及ぼす薬剤等の投与を受けている者は除外した。さらに成人病検診受診者6900名(男4902名, 女1998名, 年齢30-72歳)についてHDL-C濃度別の頻度分布を作製した。

[DNA 解析] I14Aを検出するためにプライマー(F-14AとR-14A)を、D442Gを検出するためにプライマー(F-D442GとR-D442G)を用いてpolymerase chain reaction(PCR)で増幅した。なおI14Aの変異があれば制限酵素 Nde I で、D442Gの変異があればMsp Iで認識されるようにR-14AとF-D442Gには一塩基置換を挿入した。この増幅産物を各制限酵素で消化した後3% Nu-Sieve GTG アガロースゲルで電気泳動、染色し各バンドパターンより判定した。

[CETP 活性測定] CETP 活性測定はAlbers の変法によった。

[血清脂質測定] 総cholesterolとtriglycerideは酵素法、HDL-Cはリントングステン酸/デキストラン硫酸/マグネシウム法によりHDLを他のリポ蛋白より分離し、酵素法にて測定した。LDL-cholesterolはFreidewaldの式よりもとめた。

[統計学的解析] 変異を有する者と正常者間のHDL-C値とCETP活性の比較はMann-Whitney Uテストを用いた。

[結果] 226例中44例(17.2%)に、I14AまたはD442Gのいずれかの変異を認めた。そのうち、I14A15例(ホモ接合体: 5例, ヘテロ接合体: 10例)はHDL-C 80 mg/dl以上を示し、特にホモ接合体の全例においてHDL-C 120 mg/dl以上を示した。一方、D442G 33例(ホモ接合体: 2例, ヘテロ接合体: 31例)ではHDL-C 50 mg/dl以上であった。なお、D442Gヘテロ接合体のうち4例は複合ヘテロ接合体(I14A/D442G)であり、この4例ではHDL-Cは110 mg/dl以上を呈した。これらの変異のHDL-Cのmean±SD値は、I14Aホモ接合体150±35 mg/dl, I14Aヘテロ接合体97±11 mg/dl, D442Gホモ接合体80-83 mg/dl, D442Gヘテロ接合体で77±11 mg/dl及び複合ヘテロ接合体121±4 mg/dlであった。HDL-C濃度に対する変異頻度分布を検討したところI14AはHDL-C上昇に伴って増加した。一方、D442GはHDL-C 70-79 mg/dlと110 mg/dl以上の2峰性を示した。しかし後者は全て複合ヘテロ接合体であった。6900名のHDL-Cの分布と上記の変異頻度分布より日本人の一般人口における各々の変異頻度を求めるとI14Aは0.81%, D442Gは4.62%であった。

CETP活性はI14Aホモ接合体で完全、複合ヘテロ接合体でほぼ完全、I14Aヘテロ接合体とD442Gホモ接合体で中等度、D442Gヘテロ接合体で軽度の欠損を示した。

[考察] I14Aにおける高HDL-C発症機序はこの変異により生じる不全蛋白が細胞内で異常プロセッシングを受け、活性のあるCETPが分泌されないためと考えられ、我々の成績はこれまでの報告を支持する。一方D442GのHDL-C値におよぼす効果を見たのは、この研究が初めてである。D442Gのホモとヘテロ接合体の示すHDL-C値は共に軽度の上昇を示し、両者間での差を認めなかった。これは変異CETPの正常CETPに対するdominant negative effectによるものと考えられる。本研究でI14AはHDL-C上昇に強力な効果を示すのに対し、D442Gは軽度のHDL-C上昇に関与することが明らかとなった。しかし、日本人における変異頻度はD442GがI14Aの約6倍を示し、この2つの変異頻度を合わせると5.43%となり、日本人の約20人に1人は変異を有していることになる。このことより、日本人におけるHDL-C上昇にはCETP遺伝子の変異が強く関与していると考えられる。

本研究はD442GとI14A変異の日本人における遺伝子頻度をもとめ、D442GがI14Aよりcommonな変異であり、I14AはHDL-Cの上昇に強力な効果を、D442Gは軽度の効果を及ぼすことを始めて明らかにした。審査員一同はこれを高く評価し、博士(医学)の学位に値するものと判定した。