

学 位 論 文 題 名

中国人における Cholesteryl Ester Transfer Protein 遺伝子
変異の頻度と血漿リポ蛋白代謝に及ぼす影響

学位論文内容の要旨

【諸言】

Cholesteryl ester transfer protein (CETP) は高比重リポ蛋白(HDL)に含まれる cholesteryl ester を超低比重リポ蛋白, 中間比重リポ蛋白, 及び低比重リポ蛋白 (LDL) へ転送し, 交換に triglyceride を HDL へ転送する糖蛋白である. 日本人において, CETP 遺伝子の2種類の変異, イントロン14の第一残基 (Int14A) とエクソン15 内の422番目のアミノ酸の置換 (D442G) が一般的であることが知られている. 前者は0.8%の遺伝子頻度を有し, HDL-cholesterol の著しい上昇を生じるのに対し, 後者は4.6%の遺伝子頻度で, HDL-cholesterol の軽度の上昇を生じるのが特徴である. 我々は日本人以外では初めてとなる中国人の CETP 欠損例 (D442Gヘテロ接合体) を報告した. 今回, 我々は中国人におけるD442G変異の頻度とリポ蛋白代謝への影響を検討した.

【材料と方法】

対象は北京地区の中国人健康診断受診者379例 (男性268, 女性111, 年齢18~78歳, 平均32歳) で, 空腹時に採血した. 総コレステロールとトリグリセリドは酵素法, HDL-cholesterol は直接測定法 (協和メデックス) によって測定した. LDL-cholesterol は Friedewald の式で求めた. CETP 活性の測定は Kato らの方法によった.

D442G 変異の検出は, Polymerase Chain Reaction (PCR) と制限酵素による切断を組み合わせで行った. D442G 変異があれば Msp I で切断されるように, 一方のプライマーに一塩基置換を挿入した. 切断パターンの観察は2.5%アガロースゲル電気泳動で行った.

対照に用いた札幌在住の日本人健康診断受診者139例については, 試料の採取と保存, 分析の条件はすべて 中国人の場合と同様に行った.

変異群と非変異群の脂質レベルの差は Mann-Whitney *U* test で検定した.

【結果】

中国人の379検体中, 16例をD442Gヘテロ接合体と認めた (遺伝子頻度2.1%). 変異群と非変異群の間で血清HDL-cholesterol濃度には有意な差はなかった. 血清total cholesterol 濃度は非変異群で 146 ± 36 mg/dl ($n = 363$) であるのに対して, 変異群で 122 ± 28 mg/dl と有

意に低下していた。血清LDL-cholesterol濃度は非変異群の 77 ± 30 mg/dl に対し、変異群で 56 ± 24 mg/dl と有意な低下を示した。LDL-cholesterol /HDL-cholesterol比は変異群で比変異群より有意に低下していた。一方、日本人では139例中9例にD442Gヘテロ接合体を認めた（遺伝子頻度3.2%）。日本人の非変異群と変異群の間の血清リポ蛋白プロファイルの比較では中国人の場合と全く異なる結果が得られた。すなわち、血清total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol には有意な差を認めなかったが、血清HDL-cholesterolは非変異群の 62 ± 15 mg/dlに対し変異群で 72 ± 13 mg/dlと有意な増加を認めた。なお、LDL-cholesterol/HDL-cholesterol比が、変異群で有意に低下していたのは中国人の場合と同様であった。

中国人の血清CETP活性は非変異群で $9.5 \pm 2.3\%$ であるのに対して、変異群で $3.6 \pm 2.5\%$ と有意に低下していた。同一のアッセイにおける日本人非変異群のCETP活性値は $11.0 \pm 2.2\%$ で、これと比べると中国人非変異群では軽度だが有意の低下を観察した。

【考察】

CETP欠損症の報告は最近まで日本人例に限られてきたが、著者らは中国人症例の発見に続き、本研究により中国人に高頻度にCETP欠損症が存在することを見だし、遺伝子頻度を決定した。

日本人ではD442Gヘテロ変異が血中HDL-cholesterol濃度を上げるのと異なり、中国人D442G変異群では高HDL-cholesterol血症は観察されず、むしろ低LDL-cholesterolが観察された。中国人においてD442G変異がこのような特異な表現を示したことには、中国人の血清total cholesterol濃度が日本人よりも低いことが関係すると考えられる。これには栄養条件の違いが関与する可能性が大きい。

低栄養状態ではCETPの合成と分泌が低下することが知られているが、実際に、本研究では中国人非変異者は日本人非変異者よりもCETP活性が有意に低かった。これは、低栄養状態に起因する低cholesterol血症に対して、LDL-cholesterolを代償にすることによりHDL-cholesterolを高く維持するメカニズムが働いていると解釈できる。中国人変異群の非変異群に対するCETP活性の低下は日本人非変異群の場合よりも著しいが、これも中国人変異群で特に強い低cholesterol血症が観察されたことと関係すると考えられる。

中国人変異群で同非変異群よりも強い低cholesterol血症が出現する原因としてLDL代謝回転の亢進が一つの可能性として考えられるが、その詳細な機序とD442G変異が中国人の動脈硬化に及ぼす影響については今後の検討が必要である。

【結語】

1. 中国人のCETP遺伝子のD442G変異の遺伝子頻度を2.1%と決定した。
2. CETP欠損は中国人のリポ蛋白代謝における重要な遺伝的因子である。
3. 中国人D442G変異群の特異な血清リポ蛋白プロファイルの背景には、栄養条件の違いと、これに関連するCETP活性の低下が関与すると推測される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 北 畠 顯

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

中国人における Cholesteryl Ester Transfer Protein 遺伝子 変異の頻度と血漿リポ蛋白代謝に及ぼす影響

Cholesteryl ester transfer protein (CETP) は高比重リポ蛋白 (HDL) に含まれる cholesteryl ester を超低比重リポ蛋白, 中間比重リポ蛋白, 及び低比重リポ蛋白 (LDL) へ転送し, 交換に triglyceride を HDL へ転送する糖蛋白である。日本人において, CETP 遺伝子の2種類の変異, イントロン14の第一残基 (Int14A) とエクソン15 内の422番目のアスパラギン酸からグリシンへの置換(D442G)が一般的であることが知られている。前者は0.8%の遺伝子頻度を有し, HDL-cholesterolの著しい上昇を生じるのに対し、後者は4.6%の遺伝子頻度で, HDL-cholesterol の軽度の上昇を生じるのが特徴である。本研究は中国人のCETP変異 (D442G) を検索し、中国人におけるD442G変異の遺伝子頻度とリポ蛋白代謝への影響を検討したものである。

対象は北京地区の中国人健康診断受診者379例 (男性268, 女性111, 年齢18~78歳, 平均32歳) で, 空腹時に採血した。総コレステロールとトリグリセリドは酵素法, HDL-cholesterolは直接測定法 (協和メデックス) によって測定した。LDL-cholesterolはFriedewald の式で求めた。CETP活性の測定はKatoらの方法によった。

D442G変異の検出は, Polymerase Chain Reaction (PCR) と制限酵素による切断を組み合わせで行った。D442G変異があれば Msp I で切断されるように, 一方のプライマーに一塩基置換を挿入した。切断パターンの観察は2.5%アガロースゲル電気泳動で行った。

対照に用いた札幌在住の日本人健康診断受診者139例については, 試料の採取と保存, 分析の条件はすべて 中国人の場合と同様に行った。

変異群と非変異群の脂質レベルの差はMann-Whitney U test で検定した。

中国人の379検体中, 16例にD442Gヘテロ接合体を認めた (遺伝子頻度2.1%)。変異群と非変異群の間で血清HDL-cholesterol濃度には有意な差はなかった。血清total cholesterol 濃度は非変異群で 146 ± 36 mg/dl ($n=363$) であるのに対して, 変異群で122

±28 mg/dl と有意に低下していた。血清LDL-cholesterol 濃度は非変異群の77±30 mg/dl に対し、変異群で56±24mg/dl と有意な低下を示した。一方、対照とした日本人では139 例中9例にD442Gヘテロ接合体を認めた（遺伝子頻度3.2%）。日本人の非変異群と変異群の間の血清リポ蛋白プロファイルの比較では中国人の場合と全く異なる結果が得られた。すなわち、血清total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol には有意な差を認めなかったが、血清HDL-cholesterolは非変異群の62±15mg/dlに対し変異群で72±13 mg/dlと有意な増加を認めた。

中国人の血清CETP活性は変異群で3.6±2.5%、非変異群で9.5±2.3%であった。同一アッセイにおける日本人非変異群のCETP活性値は11.0±2.2%で、軽度だが日本人のCETP活性は中国人のそれより有意に高かった。

CETP欠損症の報告は最近まで日本人例に限られてきたが、本研究により中国人にも高頻度にCETP変異 (D442G) が存在することを見だし、その遺伝子頻度を決定した。

日本人ではD442G変異ヘテロが血中HDL-cholesterol濃度を上げるのと異なり、中国人では高HDL-cholesterol血症は観察されず、むしろ低LDL-cholesterolが観察された。中国人においてD442G変異がこのような特異な表現を示したことには、中国人の血清total cholesterol濃度が日本人よりも低いことが関係すると考えられる。低栄養状態ではCETPの合成が低下することが知られおり、中国人非変異者が日本人非変異者よりもCETP活性が有意に低かったことは、これを裏づける。これは、低栄養状態に起因する低cholesterol血症では、CETPを抑えることでHDLからLDへの転送を減少させ、HDL-cholesterolを高く維持するメカニズムが働いていると解釈できる。中国人変異群のCETP活性の著しい低下は、強い低cholesterol血症があることと関係すると考えられる。

公開発表に際して、副査の北畠教授から、ハワイ日系人で見られた変異群における虚血性心疾患が中国人変異群に見られたか、中国人変異群の栄養学的パラメータについて、副査の石橋教授から、CETP変異のリスクファクターとしての意義、中国人でのLDLとHDLの変化のメカニズム、循環器内科の藤井医師からCETP活性低下のメカニズム、主査の小林教授から日本人と中国人の同一変異でのCETP活性低下の程度について、などの質問があったが、申請者は概ね妥当な回答をした。

本研究は、CETPのD442G変異の遺伝子頻度を日本人以外ではじめて明らかにしたこと、同一の変異でも日本人と中国人ではリポ蛋白プロファイルに差が生じるのは栄養状態が大きく関係すること、即ち、同一遺伝子変異でもそのフェノタイプは環境要因で変化する現象があることを見出した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。