

学 位 論 文 題 名

原発性Ⅳ型高トリグリセリド血症の成因解明を可能にした
リポ蛋白リパーゼ遺伝子解析法の開発に関する研究

学位論文内容の要旨

最近、Ⅳ型高トリグリセリド (triglyceride: TG) 血症は小粒子高密度 LDL (low density lipoprotein) の生成に深く関わっていることが分かり、これが冠動脈疾患のリスクを上げることも分かってきた。Ⅳ型高 TG 血症の発症と TG 分解酵素 LPL 遺伝子欠損症ヘテロ接合体との関係を解明することは、早期診断・治療・予防など医療上極めて重要なことである。今回、Ⅳ型高 TG 血症の成因解明を目指し、LPL 遺伝子欠損症ヘテロ接合体を検出するために直接シーケンス法を改良した。これを用いてⅣ型高 TG 血症者 32 例中 LPL 蛋白量が低値の 24 例のうち DNA が入手可能な 10 例の LPL 遺伝子を解析したところ、全例に LPL 遺伝子欠損症ヘテロ接合体を見出した。このことはⅣ型高 TG 血症の成因に LPL 遺伝子異常症ヘテロ接合体が深く関与していることを示しており、以下にその結果を記す。

1. Ⅳ型高 TG 血症の病因酵素：LPL 遺伝子解析Ⅰ

今回、Ⅳ型高 TG 血症は LPL 欠損症ヘテロ接合体を持つ者が食生活など環境の変化により TG の合成を亢進させる因子を得て、TG 分解系の異常に TG 合成系の異常が加わることで発症するという仮説を立て、Ⅳ型高 TG 血症の原因遺伝子が LPL 欠損症ヘテロ接合体であることを証明するために、LPL 欠損症ヘテロ接合体者からⅣ型高 TG 血症者を検出することを試みた。

まずⅠ型高 TG 血症を呈する LPL 欠損症ホモ接合体者 TN を有する N 家系に着目し、血漿リポ蛋白や LPL の遺伝子型などについて詳細に調べ、LPL 遺伝子のエキソン 5 に 1 塩基の欠失が存在する LPLarita を発見した。N-家系には LPLarita ヘテロ接合体者が 8 例存在し、8 例中 3 例がⅣ型高 TG 血症を示し他の 5 例は正脂血症者であった。3 例の高 TG 血症者和其他の 5 例の臨床データを比較した結果、3 例の高 TG 血症者は他の 5 例と比較してアルコール摂取量が有意に高く、体格指数も高い傾向が見られた。これらの結果から、LPL 欠損症ヘテロ接合体者の高 TG 血症は、遺伝的背景として LPL 欠損症ヘテロ接合体を持ち、さらに環境因子として肝臓での TG の合成を亢進する因子が加わることで発症したと推察された。

2. Ⅳ型高 TG 血症の病因酵素：LPL 遺伝子解析Ⅱ

上記仮説を証明するため、次に姻戚関係のないⅣ型高 TG 血症者から LPL 欠損症ヘテロ接合体を検出することを試みた。本研究では高 TG 血症者の中から、血清 TG 値が 150mg/dl を超え、ホルモン異常、糖尿病、耐糖能異常がなく、高度肥満もない、姻戚関係のないⅣ型高 TG 血症者 32 例（男 22 例、女 10 例）を対象に、サンドイッチ EIA 法を用いて免疫学的に活性のある LPL 蛋白量を測定し、健常人の約半分（150 ng/ml）またはそれ以下の者をスクリーニングした。その結果、32 例中 24 例（75%）において LPL 蛋白量が正常値の約半分以下を示した。さらにこれらについて LPL 異常遺伝子を PCR-SSCP 法による二次ス

クリーニングで探索した。ここで正常のパターンと異なるものについて、サブクローニングによるシーケンス法を用いて、異常遺伝子部位の配列を決定した。LPL エキソン 6 を PCR-SSCP 法でスクリーニングすることによって、私は LPL 欠損症ヘテロ接合体を持つ患者を見だし、その遺伝子変異を新しい変異 LPLobama として同定することができた。

LPLobama は、エキソン 6 の 972 番目の C が A に置換し、その結果 239 番目のアミノ酸が終始コドンとなり、未成熟な蛋白となる変異であった。

3. LPL 遺伝子異常症ヘテロ接合体検出を目指した直接シーケンス法の改良

IV型高 TG 血症の成因を解明するために、多くの本症患者の LPL 遺伝子を迅速かつ正確に解析する必要性が生じた。直接シーケンス法は、サブクローニングを行って塩基配列決定する方法と比べ迅速且つ簡便であり、また正常アレルと変異アレルを同時に検出することから、ヘテロ接合体の検出に大変適している。しかし良い条件のシーケンス用プライマーがデザインできないこともあり、特定の部位の塩基配列が決定できない場合もある。

LPL 遺伝子はいずれのエキソンともその両側にあるイントロン配列情報が 40 塩基とごく限られている。従って鋳型となるエキソンを PCR 増幅するプライマーと、PCR 増幅産物をシーケンスするためのプライマーをデザインするには、エキソンの両側に隣接しているイントロン情報の 40 塩基を十分に有効利用する必要がある。PCR 増幅用プライマーの作製用に、40 塩基のイントロンの 5'側から 20~30 塩基を LPL 遺伝子特異的な配列として用いた。更にこれらの配列の 5'末端に 9 塩基のタグ配列を付加して鋳型 DNA を増幅する PCR 増幅用プライマーとした。次にエキソン 1~9 の PCR 産物の塩基配列決定用に、それぞれシーケンス用プライマーを作製した。一つの PCR 産物のシーケンス用プライマーとして、PCR 産物を 5'末端から読むものと 3'末端から読むものと二種類作製した。シーケンス用プライマーの配列は PCR 増幅用プライマーの 5'側の 20 塩基と同じで、9 塩基のタグ配列を含んでいた。この工夫によりシーケンス用プライマーからアクセプター及びドナーまでの距離が 19 塩基となり、アクセプター及びドナー配列を読み易くすることをができた。シーケンス用プライマーの T_m 値は、付加した 9 塩基のタグ配列の A+T/G+C 比を調整することで、48~58℃の範囲に設定した。プライマーの T_m 値をこの範囲に設定すると非特異的なバンドがない低バックグラウンドのラダーパターンが得られた。この方法を LPLarita 及び LPLobama のヘテロ接合体の検出で評価したところ良好であった。この方法を更に改良して低バックグラウンド化を図り、オートシーケンサーへの応用も可能にした。これらの方法を用いて IV型高 TG 血症者で LPL 蛋白量低値者 24 例中 10 例について LPL 遺伝子の解析を行った。

4. 改良型直接シーケンス法を用いた IV型高 TG 血症者からの LPL ヘテロ接合体の検出

遺伝的背景の不明な IV型高 TG 血症者 32 例中、LPL 蛋白量が低値の 24 例中 DNA が入手できた 10 例について LPL 遺伝子異常を解析した結果、全例に遺伝子変異ヘテロ接合体を検出することができた。10 例の内訳は、LPLarita アレルのヘテロ接合体 1 例、LPLobama (239Cys→stop) アレルのヘテロ接合体 1 例、LPLkobe (261Ala→Thr) アレルのヘテロ接合体 2 例、LPLmima (270Phe→Leu) アレルのヘテロ接合体 1 例、LPLtokushima-1 (278Cys→Arg) アレルのヘテロ接合体 1 例、LPLtokushima-2 (43Asn→Ser) アレルのヘテロ接合体 1 例、LPLosaka (イントロン 3 の変異) アレルのヘテロ接合体 3 例であった。今回同定された LPL 変異で、LPLarita を除く 6 種類の変異はすべて新しく同定されたものであった。今回の研究結果より、IV型高 TG 血症は遺伝的背景に LPL 遺伝子ヘテロ接合体を持つ者に環境因子として TG 合成亢進を引き起こす付加が加わることで発症することが強く示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	野 村 靖 幸
副 査	教 授	有 賀 寛 芳
副 査	助教授	大 熊 康 修
副 査	助教授	松 本 健 一

学 位 論 文 題 名

原発性Ⅳ型高トリグリセリド血症の成因解明を可能にした リポ蛋白リパーゼ遺伝子解析法の開発に関する研究

申請者は、動脈硬化惹起性Ⅳ型高トリグリセリド (triglyceride: TG) 血症の成因解明を目指し、リポ蛋白リパーゼ (lipoprotein lipase: LPL) 遺伝子欠損症ヘテロ接合体を検出するために直接シーケンス法を改良し、本方法を用いてⅣ型高 TG 血症者 32 例中 LPL 蛋白量が正常値の半分またはそれ以下の 24 例中 DNA が入手可能な 10 例の LPL 遺伝子を解析したところ、全例に LPL 遺伝子欠損症ヘテロ接合体を見出した。これはⅣ型高 TG 血症の成因に LPL 遺伝子異常症ヘテロ接合体が深く関与していることを示す知見であり、これらをまとめて本学位論文として申請した。

申請者は、Ⅳ型高 TG 血症は LPL 欠損症ヘテロ接合体を持つ者が食生活など環境の変化により TG の合成を亢進させる因子を得て、TG 分解系の異常に TG 合成系の異常が加わることで発症するという仮説を立て、Ⅳ型高 TG 血症の原因遺伝子が LPL 欠損症ヘテロ接合体であることを証明するために、まず LPL 欠損症ヘテロ接合体者からⅣ型高 TG 血症者を検出することを試みた。そこで申請者を含めた研究グループはⅣ型高 TG 血症を呈する LPL 欠損症ホモ接合体者 TN を有する N 家系に着目し、血漿リポ蛋白や LPL の遺伝子型などについて詳細に調べた。この研究で申請者は遺伝子解析を行いエキソン 5 に新しい遺伝子変異 LPLarita を発見した。N-家系には LPLarita ヘテロ接合体者が 8 例存在し、8 例中 3 例がⅣ型高 TG 血症を示していることを実証した。申請者はつぎに姻戚関係のないⅣ型高 TG 血症者から LPL 欠損症ヘテロ接合体を検出することを試みた。本研究では高 TG 血症者の中から、血清 TG 値が 150mg/dl を超え、ホルモン異常、糖尿病、耐糖能異常がなく、高度肥満もなく、姻戚関係のないⅣ型高 TG 血症者 32 例 (男 22 例、女 10 例) を対象に、サンドイッチ EIA 法を用いて免疫学的に活

性のある LPL 蛋白量を測定し、健常人の約半分 (150 ng/ml) またはそれ以下の者をスクリーニングした。その結果、32 例中 24 例 (75%) において LPL 蛋白量が正常値の約半分以下を示した。さらにこれらについて LPL 遺伝子を解析し、その結果エキソン 6 に LPL 欠損症ヘテロ接合体を持つ患者を見出し、その遺伝子変異を新しい変異 LPLobama として同定することができた。

IV 型高 TG 血症の成因を解明するために、残りすべての本症患者の LPL 遺伝子を迅速かつ正確に解析する技術の必要性が生じた。ここで直接シーケンス法に着目した。直接シーケンス法は、サブクローニングを行って塩基配列決定する方法と比べ迅速且つ簡便であり、また正常アレルと変異アレルを同時に検出できることから、ヘテロ接合体の検出に大変適している。しかしは良い条件のシーケンス用プライマーがデザインできないこともあり、特定の部位の塩基配列が決定できない場合もある。LPL 遺伝子はこの遺伝子の範疇に入っていた。なぜなら LPL 遺伝子はいずれのエキソンともその両側にあるイントロン配列情報が 40 塩基とごく限られており、良い条件のプライマーの設定が容易ではなかったからである。申請者はこの限られたイントロン情報を基にプライマーを工夫し直接シーケンス法の改良を行い、LPL 遺伝子の解析を正確かつ迅速に行うことが可能な方法として完成した。この方法を LPLarita 及び LPLobama のヘテロ接合体の検出で評価したところ良好であった。この方法をさらに改良して低バックグラウンド化を図り、オートシーケンサーへの応用も可能にした。

これらの方法を用いて IV 型高 TG 血症者で LPL 蛋白量低値者 24 例中 10 例について LPL 遺伝子の解析を行った結果、10 例全例に遺伝子変異ヘテロ接合体を検出することができた。10 例の内訳は、LPLarita アレルのヘテロ接合体 1 例、LPLobama (239Cys→stop) アレルのヘテロ接合体 1 例、LPLkobe (261Ala→Thr) アレルのヘテロ接合体 2 例、LPLmima (270Phe→Leu) アレルのヘテロ接合体 1 例、LPLtokushima-1 (278Cys→Arg) アレルのヘテロ接合体 1 例、LPLtokushima-2 (43Asn→Ser) アレルのヘテロ接合体 1 例、LPLosaka (イントロン 3 の変異) アレルのヘテロ接合体 3 例であった。今回同定された LPL 変異で、LPLarita を除く 6 種類の変異はすべて新しく同定されたものであった。

今回の研究結果より、申請者は IV 型高 TG 血症が遺伝的背景に LPL 遺伝子ヘテロ接合体を持つ者に環境因子として TG 合成亢進を引き起こす付加が加わることで発症すると結論づけた。

以上、本審査委員会は本論文を直接シーケンス法の改良を行い LPL 遺伝子の解析を正確かつ迅速に行えるようにし、本方法を用いて原発性 IV 型高 TG 血症者の中に LPL 遺伝子異常症ヘテロ接合体を見だし、それらの変異のほとんどが世界で初めて発見されたものであり、そしてこれらが動脈硬化惹起性 IV 型高 TG 血症の成因と深く関わっていることを示唆した内容であると判定し、博士 (薬学) の学位を受けるに十分値すると認めた。