

Restriction Fragment Length Polymorphisms in Apolipoprotein genes in Coronary Heart Disease and Diabetes Mellitus

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8196

冠動脈硬化症ならびに糖尿病患者におけるアポリポ蛋白 遺伝子の制限酵素切断多型性に関する研究

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

伊 藤 英 章

(平成2年4月27日受付)

低比重リポ蛋白 low density lipoprotein (LDL) の血中濃度の高いヒトや、高比重リポ蛋白 high density lipoprotein (HDL) の血中濃度の低いヒトでは冠動脈硬化症の発生率の高いことが疫学調査によって明らかにされている。血清脂質やリポ蛋白濃度は遺伝的影響を受けているが、冠動脈硬化症の発症に関連した遺伝的背景を調査するために、LDL の主要アポ蛋白 B および HDL の主要アポ蛋白 AI 遺伝子に関する制限酵素切断多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) を陳旧性心筋梗塞患者57例、対照者64例を対象とし Southern blot 法により検討した。アポ蛋白 AI の制限酵素 PstI 切断による RFLP では allele P1 (2.2kilobase, kb) と allele P2 (3.3kb) を認めた。両群間で遺伝子型の分布に有意差を認めなかった。しかし P1P2 症例では P1P1 症例に比較して血清トリグリセリド濃度が有意に高値であった。制限酵素 SstI 切断では allele S1 (4.5kb, 5.7kb) と S2 (3.2kb, 5.7 kb) を認めた。対照群では遺伝子型 S1S1 14例, S1S2 36例, S2S2 14例に対し、心筋梗塞群では S1S1 20例, S1S2 34例, S2S2 3例であり、対照群に比較して心筋梗塞群では S2 の出現頻度が有意に低値であった。即ち、S2 を有する症例では心筋梗塞を発症しにくい可能性が示唆された。また、S2 の出現頻度は欧米の報告より高くこの RELP には人種差の存在するものと思われた。アポ蛋白 B の、3' 末端の complementary DNA を用いた解析では、制限酵素 EcoRI 切断では allele R1 (11kb) と allele R2 (13kb) を、制限酵素 MspI 切断では 2.5kb 未満の allele M1 と 2.5kb 以上の allele M2 を認めたが、これらの RFLP と冠動脈硬化症との関連は認められなかった。次にリポ蛋白代謝異常症を合併することの多い糖尿病症例においてこれらの RFLP の影響を検討するために、糖尿病症例49例と正脂血症対照者32例を抽出し同様の解析を行った。対照群では allele P2 の有無で脂質レベルに差異を認めなかったが、糖尿病群では P1P1 症例と比較して P1P2 症例において血清総コレステロール濃度が有意に高値であった。糖尿病における高コレステロール血症にこの RFLP の関与が示唆された。以上より、冠動脈硬化症や糖尿病におけるリポ蛋白代謝異常症の遺伝的素因の検索法としてアポ蛋白 AI 遺伝子 RFLP が有用であることが示唆された。

Key words coronary heart disease, restriction fragment length polymorphism, apolipoprotein AI, apolipoprotein B, diabetes mellitus

疫学調査により冠動脈硬化症の危険因子にはリポ蛋白代謝異常症、高血圧症、喫煙をはじめ多数の因子が知られている¹⁾。リポ蛋白代謝異常症の中でも、低比

重リポ蛋白 low density lipoprotein (LDL) の血中濃度の高いヒトや、高比重リポ蛋白 high density lipoprotein (HDL) の血中濃度の低いヒトでは冠動脈

Abbreviations: apoAI, apolipoprotein AI; apoB, apolipoprotein B; BMI, body mass index; cDNA, complementary DNA; CETP, cholesteryl ester transfer protein; CHD, coronary heart disease; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid 2 Na; FH, familial hypercholesterolemia; HDL, high density lipoprotein; kb, kilobase pairs; LCAT, lecithin

硬化症の発生率の高いこと、また、それらの治療が冠動脈疾患による死亡率を低下させたという大規模かつ長期的な研究成果も報告されている²³⁾。アポ蛋白 B には、外因性リポ蛋白代謝の中で重要な役割を担うアポ蛋白 B-48 と内因性リポ蛋白の主要構成成分アポ蛋白 B-100 の 2 種類のイソ蛋白がある⁴⁾。アポ蛋白 B-100 は LDL の主要アポ蛋白であり、LDL 粒子が LDL リセプターに取り込まれる際のリガンドとしての働きを持っている⁵⁾。アポ蛋白 B-100 は分子量が大きく溶媒に不溶性であることより、アミノ酸組成、蛋白質としての物理化学的特性の解析が遅れていた。しかし、アポ蛋白 B-100 の相補鎖 DNA (complementary DNA, cDNA) がクローン化されて以来⁶⁻⁹⁾、アポ蛋白 B-100 の遺伝子レベルでの解析が可能となった。それによると、アポ蛋白 B-100 遺伝子は第 2 染色体の短腕遠位部 (p24 region) に存在し^{8,9)}、全長約 43 キロ塩基対 (kilobase pairs, kb) で 29 個のエクソンに分かれ、4563 個のアミノ酸をコードしている¹⁰⁾。アポ蛋白 B-100 は分子量約 512000 であり、LDL リセプターとの結合部位のアミノ酸組成がアルギニン、リジンに富み陽性に荷電しており¹¹⁾、その構造が LDL リセプターの陰性荷電と対応することがわかった⁶⁾。また、アポ蛋白 B-100 と B-48 の違いは、2153 番のアミノ酸の塩基配列が肝細胞より得られた cDNA ではシトシン、アデニン、アデニン (CAA) でグルタミンをコードしているのに対し、小腸細胞より得られた cDNA ではチミン、アデニン、アデニン (TAA) のストップコドンとなるため^{12,13)} 一つの遺伝子から臓器特異性に 2 種類の蛋白が発現するものであることがわかった。

一方、HDL は末梢組織より余剰のコレステロールを肝臓へ逆転送する役割を持ち、冠動脈硬化症の負の危険因子¹⁴⁾とされている。アポ蛋白 AI は HDL の主要構成蛋白であり、cDNA がクローン化されている¹⁵⁾。アポ蛋白 AI 遺伝子¹⁶⁾は第 11 染色体、長腕遠位部¹⁷⁾にアポ蛋白 CIII, AIV 遺伝子に隣接して存在し¹⁸⁾、18 個のアミノ酸からなるプレペプチドと 6 個のアミノ酸からなるプロペプチドが切断されて 243 個の蛋白として分泌されること¹⁹⁾、プロリンで始まる 22 個のアミノ酸配列は α ヘリックス構造に合致し、極性部がリポ蛋白表面に、非極性部がリポ蛋白粒子中核に位置し、この特性は他のアポ蛋白においても認められること²⁰⁾がわかっている。

冠動脈硬化症を発症するリポ蛋白代謝異常症の中には、家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia, FH)²¹⁾ や家族性複合型高脂血症²²⁾ などの遺伝性疾患が含まれている。FH は LDL リセプターの異常により高 LDL 血症を呈する疾患であり、分子遺伝学的に解明された症例²³⁾ もあるが、他の遺伝性リポ蛋白代謝異常症については多くが原因不明である。

本研究の第 1 の目的は冠動脈硬化症の発症に関連した遺伝的背景を調査するために、LDL の主要アポ蛋白 B-100 および HDL の主要アポ蛋白 AI についての制限酵素切断による遺伝子多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) を陳旧性心筋梗塞患者と冠動脈硬化症のない対照者において比較し、冠動脈硬化症およびリポ蛋白代謝異常症に関連した allele を検討することである。一方、糖尿病患者には高脂血症を合併する頻度が高くマクロアングイオパチーの進展に関与している²⁴⁾。そこで糖尿病の有無で分けられた 2 群間でこれらの RFLP を調査し、糖尿病患者においてリポ蛋白代謝異常症を発現しやすい allele を検討することが第 2 の目的である。

対象および方法

I. 対象

心筋梗塞発症後 3 ヶ月を経過した症例 57 例と冠動脈硬化症のないコントロール群 64 例合計 121 例を対象とした。心筋梗塞の診断は臨床症状、心電図変化、心筋由来酵素の上昇に基づいて行い、冠動脈造影上 75% 以上の有意狭窄 1 枝以上有する症例を選んだ。また、冠動脈硬化症を有しないコントロール群は、臨床症状がなく、心電図上ダブルマスター負荷で有意の STT 変化を示さない症例とし、高脂血症、高血圧症、喫煙、糖尿病、肥満の有無は問わないこととした。また、コントロール群 64 例の中には高脂血症、糖尿病を有さない正脂血症者群 32 例が含まれていた。この群は、早朝空腹時の血清総コレステロール 220mg/dl、血清トリグリセリド 180mg/dl 以下であることとした。

II. 方法

1. 高分子 DNA の抽出

対象者の末梢静脈血を ethylenediaminetetraacetic acid 2Na (EDTA) を抗凝固剤として採取し、 -20°C にて冷凍保存した。この末梢血を室温で解凍後、

cholesterol acyltransferase; LDL, low density lipoprotein; MI, myocardial infarction; RFLP, restriction fragment length polymorphism; TC, total cholesterol; Tris, Tris [hydroxymethyl] aminomethane; VLDL, very low density lipoprotein

Triton X-100 融解変法²⁹⁾にて以下のように高分子 DNA を単離した。まず、320mM ショ糖、1% Triton X-100, 5mM MgCl₂, 10mM Tris [hydroxy-methyl] aminomethane (Tris), pH 7.6 を含む融解液にて赤血球を溶血させ、遠心により沈殿として白血球を集めた。これをプロテアーゼ (シグマ社, アメリカ) にて消化後, DNA をフェノール・クロロホルム (1:1) で1回, 続いてクロロホルム・イソアミルアルコール (24:1) にて2回抽出し, 最後にエタノールにて沈殿させた。こうして得られた DNA を 10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0 に溶解し, 260nm における吸光度の測定により DNA 濃度を求めた ($E_{260}^{1\text{cm}} = 50 \mu\text{g/ml}$)。

2. Southern トランスファー

高分子 DNA 5 μg を4種類の制限酵素 Pst I, Sst I, EcoRI, Msp I (宝酒造, 京都) 10-50単位を使って12-24時間消化し, 0.8%アガロースゲル (Pst I, Sst I, EcoRI 消化の場合) および, 1.5%アガロースゲル (Msp I 消化の場合) にて電気泳動を行った。その後 Southern 法³⁰⁾に準じて以下のようにトランスファーを行った。まず, 泳動終了後のゲルを 0.5M 水酸化ナトリウム, 1.5M 塩化ナトリウム溶液に浸し30分間室温でゆっくり振盪させ, これを2回行うことで DNA を変性させた。次にゲルを蒸留水で水洗後, 1M Tris, 1.5M 塩化ナトリウム, pH7.4 の溶液に浸し, 30分間室温で2回ゆっくり振盪し中和した。その後 5 \times SSC (saline sodium citrate, 20 \times SSC の組成は

3M 塩化ナトリウム, 0.3M クエン酸3ナトリウム) にて1度ゲルを洗い, 15 \times SSC を使って平均孔径 0.2 μm のニトロセルロース・フィルター (シュライヒャー・シュエル社, 西独) にトランスファーした。トランスファー後のフィルターは室温で風乾した後, 乾熱機を使って80°Cで3時間ベイクングし, DNA を固定した。

3. プロープの作成

アポ蛋白 AI 遺伝子の制限酵素 Pst I 切断遺伝子クローンがプラスミド pUC8 に組み込まれたもの²⁹⁾ を Humphries らのグループ (聖マリー医科大学, イギリス) から提供を受けた。これを塩化カルシウム法³⁰⁾により大腸菌 E. Coli K2 JM101 株にトランスフォームさせた。この大腸菌よりアルカリ法によってプラスミド DNA を回収し, 制限酵素 Pst I 切断後, 0.8%アガロースゲル電気泳動にて分離した。2.2kb の断片を DE81 の濾紙 (ワットマン社, イギリス) に吸着させた後, 抽出・精製し, これをアポ蛋白 AI 遺伝子 RFLP 用のプロープとした。アポ蛋白 B-100 遺伝子の cDNA (pB8) を含むプラスミド²⁹⁾ はがん研究振興財団リサーチリソースバンク通して Breslow らのグループ (ロックフェラー大学, アメリカ) より提供を受けた。pB8 は制限酵素 Xba, Msp I によって切断される 1.8kb の部分 cDNA であり, アポ蛋白 B-100 遺伝子の 3' 終末部に相補的部分である。これもアガロースゲル電気泳動後, DE81 の濾紙に吸着させ抽出・精製し, アポ蛋白 B-100 遺伝子 RFLP 用のプロープと

Table 1. Clinical features and serum lipid and HDL cholesterol levels in 64 controls and 57 patients with myocardial infarction

	MI (-)	MI (+)	P value
No	64	57	
age (year)	57 \pm 13.8	57.5 \pm 8.2	NS
sex (M:F)	53:19	35:14	NS
DM (%)	50%	30%	P<0.05
HT (%)	9%	19%	NS
smoking (%)	47%	61%	NS
BMI (kg/m ²)	21.6 \pm 3.2	22.6 \pm 3.0	NS
TC (mg/dl)	185 \pm 33	204 \pm 33	P<0.01
TG (mg/dl)	120 \pm 49	163 \pm 59	P<0.01
HDL-C (mg/dl)	44 \pm 11	38 \pm 9	P<0.01

Values are mean \pm SD. Diabetes(DM) and hypertension(HT) histories are defined as previous medical diagnosis. BMI, body mass index; TC, total cholesterol; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; MI(-), control group; MI(+), patient group with myocardial infarction; NS, not significant.

した。

これらのプローブ 50ng をマルチプライム・ラベリング³⁰⁾・キット (アマシャム・ジャパン社, 東京) を用いてそれぞれ [α -³²P] デオキシ CTP (同社) にて標識し 2.0-5.0cpm/ μ g の比活性を持つプローブを得た。

4. ハイブリッド形成 (ハイブリダイゼーション)

DNA を固定したニトロセルロース・フィルターを, 50%ホルムアミド, 3×SSC, 20 μ g/ml 変性サケ精子 DNA, 5×デンハルト液 (50×デンハルト液の組成は 1%フィコール, 1%ポリビニールピロリドン, 1%ウシアルブミン), 10%デキストラン硫酸を含む溶液 10ml とともにプラスチックバックに入れ, 42°Cにて2時間前ハイブリダイゼーションを行った。その後この溶液中に, サケ精子 DNA50 μ g と標識した cDNA50ng を熱変性後に加え, 12-24時間42°Cにてハイブリダイゼーションを行った。

次にこのフィルターを 3×SSC を用い 5 分間室温で洗浄した。その後 1×SSC, 1%ドデシル硫酸ナトリウム液にて 50°C10 分間の洗浄を 2 回繰り返し, 室温にて乾燥後, -80°Cで 12 時間ないし 48 時間のオートラジオグラフィを施行した。検出される断片の大きさの評価は, アガロース電気泳動の際に Hind III で切断した λ DNA 約 1 μ g を標準として同時に泳動し, その位置から計算した。

5. 血清脂質の分析

対象者からは 16 時間絶食後の早朝空腹時に採血した。血清総コレステロールはオート TCHO (シノテスト社, 東京) を, 血清トリグリセリドはネスコート TG (日本商事, 大阪) を用いて, 自動分析システム 736-60 (日立, 東京) で測定した。血清 HDL コレステロールは, ヘパリン・マンガ・ニッケルによる沈殿法 (シノテスト社) で定量した。

6. 統計処理

統計処理には, X²検定, Student の t 検定, 数量化 II 類による多変量解析³¹⁾を使用した。

成 績

I. 冠動脈硬化におけるアポ蛋白遺伝子の制限酵素切断多型性

1. 対照 [MI(-)] 群と冠動脈硬化症患者 [MI(+)] 群の一般臨床所見

両群を比較して, 糖尿病患者は MI(-) 群に有意に多かったが ($p < 0.05$), 年齢, 性差, 高血圧症, 喫煙, 肥満度 [body mass index, BMI, 体重 (kg)/身長² (m)] に差を認めなかった (表 1)。

血清総コレステロール濃度は MI(-) 群 185 \pm 33

mg/dl (平均 \pm 標準偏差) に対し, MI(+) 群 204 \pm 33 mg/dl, 血清トリグリセリド濃度は MI(-) 群 120 \pm 49 mg/dl に対し, MI(+) 群 163 \pm 59 mg/dl とそれぞれ MI(+) 群において有意 ($p < 0.01$) に高く, HDL コレステロール濃度は MI(-) 群 44 \pm 11 mg/dl に対し MI(+) 群 38 \pm 9 mg/dl と MI(+) 群において有意 ($p < 0.01$) に低値であった。

2. アポ蛋白 AI-CIII 遺伝子に関する多型性

アポ蛋白 AI-CIII 遺伝子は制限酵素 Pst I, Sst I 切断により多型性を示すことが知られている^{27,28-41)}。これはアポ蛋白 AI 遺伝子の 3' 下流側の非翻訳部に Pst I の, またアポ蛋白 CIII 遺伝子の 3' 下流にある非翻訳部に Sst I の切断多型性がある⁴²⁾ ために, Pst I 切断では 2.2kb (allele P1), 3.3kb (allele P2), Sst I 切断では 5.7kb と 4.5kb (allele S1), 5.7kb と 3.2kb (allele S2) の断片として検出される (図 1)。

これらの RFLP と冠動脈硬化症の発症との関連性

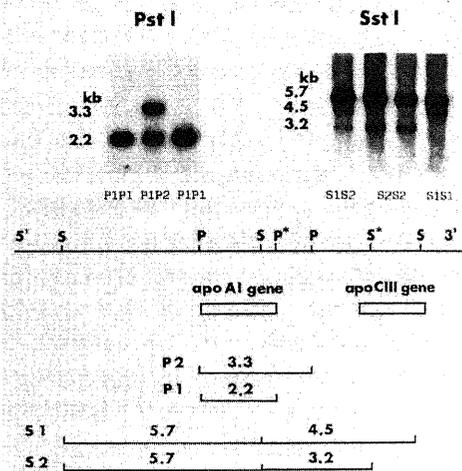


Fig. 1. Restriction fragment length polymorphisms of the apolipoprotein AI-CIII gene with the endonuclease Pst I and Sst I. Southern blot analysis of the apoAI-CIII gene digested with Pst I and Sst I, and hybridized to a ³²P-labelled apoAI gene specific probe and restriction map of the gene are shown. Enzyme sites shown are P (Pst I), S (Sst I), and the positions of the polymorphic restriction sites are shown as asterisk. Alleles with polymorphic restriction sites are designated as P1 (2.2kb) and S2 (5.7kb, 3.2kb), without polymorphic restriction sites, alleles are designated as P2 (3.3kb) and S1 (5.7kb, 4.5 kb), respectively. The genotypes of each sample are shown at the bottom of the autograph.

Table 2. Frequencies of restriction fragment length polymorphisms at the apolipoprotein AI-CIII gene in controls [MI(-)] and patients with myocardial infarction [MI(+)]

Restriction Enzyme	No	Genotype(%)			Allele		
		P1P1	P1P2	P2P2	P1	P2	
Pst I	MI(-)	64	53(83)	11(17)	0(0)	0.91	0.09
	MI(+)	57	49(86)	8(14)	0(0)	0.93	0.07
Sst I		S1S1	S1S2	S2S2	S1	S2	
	MI(-)	64	14(22)	36(56)	14(22)	0.50	0.50
MI(+)	57	20(35)*	34(60)*	3(5)*	0.65	0.35	

* P<0.05 when compared with control group in a 2x3 contingency table. X_o²=7.885>X²(0.05)=5.990.

Table 3. Distribution of combined haplotype of the apolipoprotein AI-CIII gene in controls [MI(-)] and patient group with myocardial infarction [MI(+)]

Combined haplotypes	MI(-)		MI(+)	
	No	(%)	No	(%)
P1P1S1S1	13	(20)	18	(32)
P1P2S1S1	1	(2)	2	(4)
P1P1S1S2	28	(43)	28	(48)
P1P2S1S2	8	(13)	6	(11)
P1P1S2S2	12	(19)	3	(5)
P1P2S2S2	2	(3)	0	(0)
Total	64	(100)	57	(100)

を検討するため、陳旧性心筋梗塞患者57例、MI(+)群と虚血性心疾患を有しない対照者64例、MI(-)群について解析した。その結果は表2に示した。Pst I切断では遺伝子型 P1P1, P1P2 が認められた。これら遺伝子型の分布は MI(-) 群の P1P1 53例、P1P2 11例に対し、MI(+) 群では P1P1 49例、P1P2 8例であった。両群間で遺伝子の分布ならびに allele P1, P2 の出現頻度に関し有意差は認められなかった。

Sst I 切断では遺伝子型 S1S1, S1S2, S2S2 が認められた。これら遺伝子型の分布は MI(-) 群の S1S1 14例、S1S2 36例、S2S2 14例に対し、MI(+) 群では S1S1 20例、S1S2 34例、S2S2 3例であった。両群間で遺伝子型の分布は有意に異なっていた (p<0.05)。即ち、MI(-) 群に比較して MI(+) 群では有意に allele S2 の出現頻度が少なかった。

Pst I, Sst I 切断の RFLP を組み合わせた単一遺伝子表現型 (haplotype) を検討してみると (表3)、

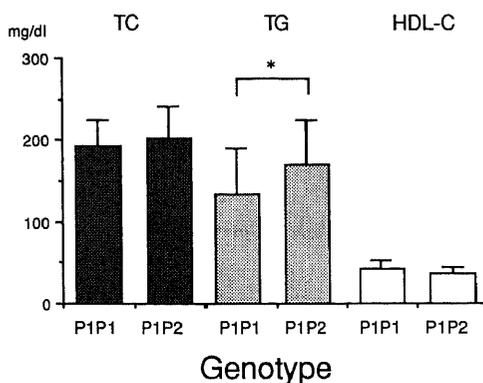


Fig. 2. Comparison of serum total cholesterol, triglyceride and HDL cholesterol level in genotype P1P1 and P1P2 of all subjects. Triglyceride level in P1P2 group (19 cases) is significantly higher than in P1P1 group (102 cases). There are no significant difference in total cholesterol and HDL cholesterol level between P1P1 group and P1P2 group. Values are mean±SD, *P<0.05. TC, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, HDL cholesterol.

MI(-) 群、MI(+) 群とも P1P1S1S2 が最も頻度の高い haplotype であったが、P1P1S1S1 は MI(+) 群に、P1P1S2S2 は MI(-) 群に多い haplotype であった。

3. アポ蛋白 AI-CIII 遺伝子に関する多型性と血清脂質との関連

MI(-) 群と MI(+) 群を合わせた121例について遺伝子型 P1P1, P1P2 の2群に分けて年齢、血清脂質、肥満度、性差、糖尿病の有無を検討した (図2)。血清総コレステロール、HDL コレステロール濃度、年齢、

性差、糖尿病の有無について両群間で有意差を認めなかったが、血清トリグリセリド濃度は P1P1 群 134 ± 57 mg/dl に対し P1P2 群 171 ± 54 mg/dl と P1P2 群で有意 ($p < 0.05$) に高く、肥満度は P1P1 群 21.8 ± 3.1 kg/m² に対し P1P2 群 23.4 ± 3.0 kg/m² と P1P2 群で有意 ($p < 0.05$) に高値であった。遺伝子型 S1S1, S1S2, S2S2 の 3 群に分けて年齢、血清脂質、肥満度、性差、糖尿病の有無を検討した (図 3) が、これらの因子において 3 群間で有意差を認めなかった。

4. アポ蛋白 B 遺伝子に関する多型性

アポ蛋白 B 遺伝子は制限酵素 Eco RI 切断により多型性を示すことが知られている^{9)29)43)~45)}。これはアポ蛋白 B 遺伝子の 29 番目のエクソンの中に site polymorphism があり、4154 番目のアミノ酸がグルタミン酸であれば Eco RI に認識されて 11kb の断片 (allele R1) として、リジンであれば認識されず 13kb の断片 (allele R2) として検出されるためである。また、Msp I 切断の場合、アポ蛋白 B 遺伝子の 3' 下流非翻訳域に挿入-欠失多型性 (insertion-deletion polymorphism) があるため²⁹⁾⁴³⁾⁴⁶⁾ に、2.5kb 未満の断片 (allele M1), 2.5kb 以上の断片 (allele M2) として検出される (図 4)。

これらの RFLPs と冠動脈硬化症の発症との関連性を検討した (表 4)。Eco RI 切断では遺伝子型 R1R1, R1R2, R2R2 が認められた。これら遺伝子型の分布は

MI(-) 群では R1R1 58例, R1R2 6例, R2R2 0例で、MI(+) 群では R1R1 52例, R1R2 4例, R2R2 1例であった。両群間で遺伝子型の分布ならびに allele R1, R2 の出現頻度に関し有意差は認められなかった。

Msp I 切断では遺伝子型 M1M1, M1M2 が認められた。これら遺伝子型の分布は MI(-) 群の M1M1 56例, M1M2 8例に対し、MI(+) 群では M1M1 53例, M1M2 4例であった。両群間で遺伝子型の分布ならびに allele M1, M2 の出現頻度に関し有意差は認められなかった。

Eco RI, Msp I 切断の RFLP を組み合わせた haplotype を検討してみると、MI(-) 群, MI(+) 群とも R1R1M1M1 が最も頻度の高い haplotype であった (表 5)。

5. アポ蛋白 B 遺伝子に関する多型性と血清脂質との関連

MI(-) 群と MI(+) 群を合わせた 121 例について遺伝子型の R1R1, R1R2 の 2 群、遺伝子型 M1M1, M1M2 の 2 群に分けて年齢、血清脂質、肥満度、性差、糖尿病の有無を検討したが、いずれの因子においても両群間で有意差を認めなかった。

6. 多変量解析によるアポ蛋白 AI 遺伝子およびアポ蛋白 B 遺伝子に関する多型性と冠動脈硬化症との関連

虚血性心疾患を有さない 64 例と陳旧性心筋梗塞患者

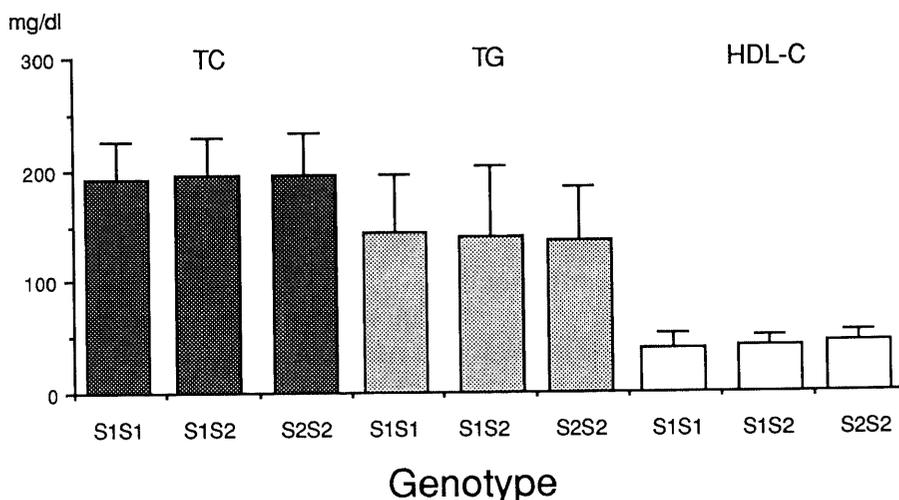


Fig. 3. Comparison of serum total cholesterol, triglyceride and HDL cholesterol level in genotype S1S1, S1S2 and S2S2 of all subjects. There are no significant difference in total cholesterol, triglyceride and HDL cholesterol level among S1S1 group (34 cases), S1S2 group (70 cases) and S2S2 group (17 cases). Values are mean \pm SD.

Table 4. Frequencies of restriction fragment length polymorphisms at the 3' end of the apolipoprotein B gene in controls [MI(-)] and patients with myocardial infarction [MI(+)]

Restriction Enzyme	No	Genotype(%)			Allele		
		R1R1	R1R2	R2R2	R1	R2	
Eco RI	MI(-)	64	58(91)	6(9)	0(0)	0.95	0.05
	MI(+)	57	52(91)	4(7)	1(2)	0.95	0.05
Msp I	No	Genotype(%)			Allele		
		M1M1	M1M2	M2M2	M1	M2	
Msp I	MI(-)	64	56(88)	8(12)	0(0)	0.94	0.06
	MI(+)	57	53(93)	4(7)	0(0)	0.96	0.04

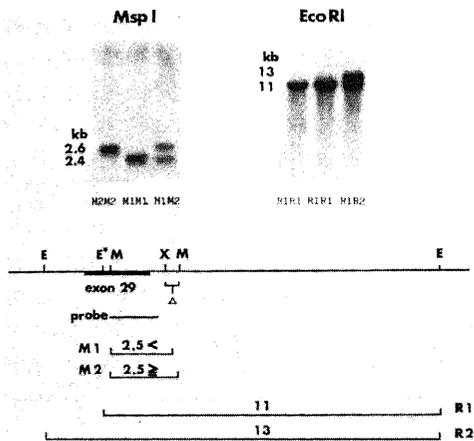


Fig. 4. Restriction fragment length polymorphisms of the 3' end of the apolipoprotein B gene with the endonuclease Eco RI and Msp I. Southern blot analysis of the 3' end of the apo B gene with Eco RI and Msp I, and hybridized to a ³²P-labelled pB8 and restriction map of the gene are shown. Enzyme sites shown are E (Eco RI), M (Msp I) and X (Xba I) and the position of polymorphic restriction site is shown as asterisk. With or without this site, an allele is designated as R1 (11kb) or R2 (13kb), respectively. The triangle indicates a region between invariant Xba I and Msp I digestion sites that varies in length because of an insertion-deletion polymorphism. Fragments shorter than 2.5 kb are designated as M1, fragments greater than or equal to 2.5 kb are designated as M2, respectively.

Table 5. Distribution of combined haplotype of the apolipoprotein B gene in controls [MI(-)] and patient group with myocardial infarction [MI(+)]

Combined haplotypes	MI(-)	MI(+)
	No (%)	No (%)
R1R1M1M1	51 (79)	48 (84)
R1R2M1M1	5 (8)	4 (7)
R1R1M1M2	0 (0)	1 (2)
R1R2M1M2	7 (11)	4 (7)
R1R1M2M2	1 (2)	0 (0)
R1R2M2M2	0 (0)	0 (0)
Total	64 (100)	57 (100)

けた。また、高血圧症、喫煙、糖尿病の有無、性別についての区分、アポ蛋白 AI-CIII 遺伝子多型性により分けられる P1P1 もしくは P1P2 の区分、S1S1, S1S2 あるいは S2S2 と分けられる 3 区分、アポ蛋白 B 遺伝子多型性により分けられる R1R1 もしくは R1R2 (R2R2 を含む) 2 区分、M1M1 または M1M2 と分けられる 2 区分を設定した。これら13種類の質的な要因によって冠動脈硬化症の発症を判別するための多変量解析を数量化II類法³⁰⁾を用いて検討した。

13種類の因子を総合して解析した相関比(正数、負数の絶対値の和、以下同様)0.510に対し、血清総コレステロールの相関比は0.888、血清トリグリセリドの相関比は1.088、HDL コレステロールの相関比は0.744と大きな値を示した(図5)。中でも総コレステロールは4グループによって段階的に冠動脈硬化症の発症に関与していることが示された。また、アポ蛋白 AI、B 遺伝子に関連した多型性の中では Pst I 切断(P1, P2)による遺伝子型の相関比0.720、Sst I 切断(S1, S2)による遺伝子型の相関比0.791と比較的大き

57例、計121例を対象に、血清総コレステロール、血清トリグリセリド、肥満度、年齢の数量化データを下位より、HDL コレステロールデータを上位よりその度数によって25%ずつ分画し、1から4のグループに分

な値をとったが、Eco RI 切断 (R1, R2) による遺伝子型の相関比0.070, Msp I 切断 (M1, M2) による遺伝子型の相関比0.439であり、アポ蛋白 B 遺伝子多型性の冠動脈硬化症発症への関与は小さかった。

これらの13因子を総合して解析した2群の相関比分布を図6に示す。MI(-) 群では相関比0.00~1.25に45例70%が分布していたのに対し、MI(+)

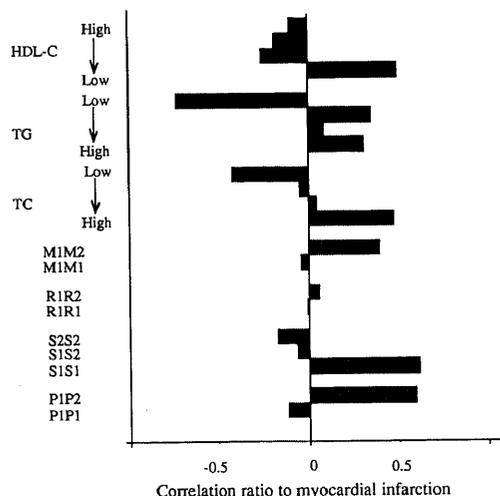


Fig. 5. Values of categories for the correlation ratio of total cholesterol, triglyceride, HDL cholesterol and apolipoprotein RFPLs. Quantification 2 analysis³⁰⁾ is a form of multivariate analysis. Parametric data on BMI, age, TC, TG and HDL-C concentration are divided into four groups from low to high, according to their values. The analysis is done using these five categories and the other eight variables including sex, hypertension, smoking, diabetes and four kinds of RFLPs. Ranges of the correlation ratio of total cholesterol, triglyceride, HDL cholesterol and two RFLPs with Pst I and Sst I are higher than the value for the all items.

関比-1.50~-0.50に35例61%が分布しており、これら2群間において相関比をパラメータとした分布は明らかに異なっていた。今回設定した冠動脈硬化症の危険因子(血清脂質, 高血圧症, 喫煙, 糖尿病, 性差)に、アポ蛋白遺伝子多型性を加えた多変量解析で、対照群と冠動脈硬化症患者群が分別された。

II. 糖尿病患者におけるアポ蛋白遺伝子多型性の検討

全症例の中より糖尿病を有する49例と糖尿病のない正脂血症対照者32例を抽出し、アポ蛋白遺伝子多型性と脂質レベルの比較検討を行った。

正脂血症対照者32例中、Pst I 切断アポ蛋白 AI 遺伝子型 P1P1 26例, P1P2 6例に対し、糖尿病群49例では P1P1 42例, P1P2 7例であった。正脂血症対照群と糖尿病群間で遺伝子型分布に有意差を認めなかった(表6)。

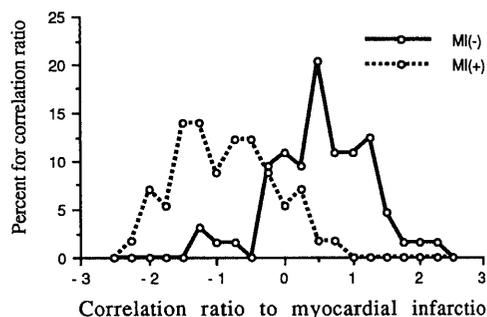


Fig. 6. Percentage distribution of two groups with or without myocardial infarction for the correlation ratio. Correlation ratio for each case was determined by the Quantification 2 analysis based on the 13 factors (BMI, age, total cholesterol, triglyceride, HDL cholesterol, sex, hypertension, smoking, diabetes mellitus and four kinds of apolipoprotein RFPLs). The distribution of the correlation ratio is clearly different between MI (-) group (—○—) and MI (+) group (···○···).

Table 6. Comparison of lipid levels, body mass index, age and sex in genotype P1P1 and P1P2 in normolipidemic controls and diabetic group

	No	Age (years)	Sex(M:F)	TC (mg/dl)	TG (mg/)	HDL-C (mg/dl)	BMI (kg/m ²)
Control group							
P1P1	26	54.5±14.8	17:9	171±25	104±29	44±7	21.7±2.4
P1P2	6	52.5±12.5	3:3	165±21	126±27	41±8	24.0±4.7
Diabetic group							
P1P1	42	58.2±11.3	30:12	200±35	137±16	43±13	21.4±3.6
P1P2	7	52.5±12.5	5:2	230±26*	184±42	34±7	23.0±2.7

* P<0.05 when compared with genotype P1P1 in diabetic group.

次に正脂血症対照群と糖尿病群それぞれにおいて遺伝子型 P1P1 と P1P2 の 2 群間で血清総コレステロール, 血清トリグリセリド, HDL コレステロールを比較した (表 6).

血清総コレステロールについては正脂血症対照群で P1P1 群 $171 \pm 25 \text{ mg/dl}$ に対し P1P2 群 $165 \pm 21 \text{ mg/dl}$ と差を認めなかったが, 糖尿病群では P1P1 群 $200 \pm 35 \text{ mg/dl}$ に対し P1P2 群 $230 \pm 26 \text{ mg/dl}$ と P1P2 群で有意 ($p < 0.05$) に高値をとった. 血清トリグリセリドについては正脂血症対照群で P1P1 群 $104 \pm 29 \text{ mg/dl}$ に対し P1P2 群 $126 \pm 27 \text{ mg/dl}$ と P1P2 群でやや高値を示したが, 糖尿病群では P1P1 群 $137 \pm 16 \text{ mg/dl}$ に対し P1P2 群 $184 \pm 42 \text{ mg/dl}$ と P1P2 群で高値をとる傾向があった. HDL コレステロールについては, 正脂血症対照群で P1P1 群 $44 \pm 7 \text{ mg/dl}$ に対し P1P2 群 $41 \pm 8 \text{ mg/dl}$ と P1P2 群でやや低値を示したが, 糖尿病群では P1P1 群 $43 \pm 13 \text{ mg/dl}$ に対し P1P2 群 $34 \pm 7 \text{ mg/dl}$ と P1P2 群で低値をとる傾向があった.

Sst I 切断アポ蛋白 AI 遺伝子型 S1S1, S1S2, S2S2 の出現頻度は正脂血症対照群でそれぞれ 8, 19, 5 例に対し, 糖尿病群では 10, 29, 10 例であり, 正脂血症対照群と糖尿病群間においてこれら遺伝子型の出現頻度に有意差を認めなかった (表 7). また, 遺伝子型 S1S1, S1S2, S2S2 の 3 群間において血清総コレステロール, 血清トリグリセリド, HDL コレステロールレベルにも有意差を認めなかった (表 7).

考 察

冠動脈硬化症の発症, 進展に関与する危険因子の中でも, リポ蛋白代謝異常症には遺伝的要因が大きく関与している⁴⁷. 遺伝性リポ蛋白代謝異常症の代表的疾患である家族性高コレステロール血症は LDL リセプ

ター異常がその本態であるが, 近年発展した分子遺伝学的手法を用いて LDL リセプターの構造が解明されたばかりでなく, 異常リセプターの構造遺伝子を解析することで出生前診断が可能となった例²³も報告されている. その他の極めてまれな遺伝性リポ蛋白代謝異常症については, 遺伝子の異常が明らかにされたものの⁴⁸もあるが, 冠動脈硬化症の発症に関与するリポ蛋白代謝異常症の中では FH 以外に原因不明のものが多く, したがってリポ蛋白代謝異常症の遺伝的背景を調査するために, アポ蛋白遺伝子に関連した制限酵素切断多型性 (RFLP) を検討することは臨床症状発現前より動脈硬化にかかりやすい人を同定でき, 冠動脈硬化症の一次予防につながる可能性⁴⁹のあることから意義があると思われる.

アポ蛋白 AI は負の危険因子と考えられる HDL 主要蛋白で, その構造遺伝子はトリグリセリドに富んだリポ蛋白の主要蛋白であるアポ蛋白 CIII 遺伝子と隣接する⁴⁹. 1983年以降アポ蛋白 AI-CIII 遺伝子に関連した RFLP の報告が集積されてきている^{27,32-41}. 制限酵素 Pst I による RFLP はアポ蛋白 AI 遺伝子の 3' 下流の非翻訳部の 1 塩基変化に基づく site polymorphism でアポ蛋白 AI のアミノ酸組成に影響を与えない. この RFLP と冠動脈硬化症との関連が Ordovas ら³²によって報告された. それによれば P2 allele 出現頻度は 60 才以下で心筋梗塞を発症した群では 0.170 であるのに対し, 対照群では 0.02 であり, 心筋梗塞群で有意 ($p < 0.0001$) に高く, 心筋梗塞群で P2 allele を有する症例 12 例の中で 8 例が家族性低 HDL 血症であった. さらに P2 allele に関連した家族性低 HDL 血症の家系⁵⁰の報告もされていることから, 低 HDL 血症の病因は多様⁵¹であるが, その一部には P2 allele と連鎖したものも含まれていると思われる. しかし, その後の報告ではこの RFLP と冠動脈硬化

Table 7. Comparison of lipid levels and body mass index, age and sex in genotype S1S1, S1S2 and S2S2 in normolipidemic controls and diabetic group

	No	Age (years)	Sex(M:F)	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	BMI (kg/m ²)
Control group							
S1S1	8	56.3±14.8	6:2	156±21	113±27	42±9	24.3±4.0
S1S2	19	52.7±15.7	12:7	171±24	106±72	43±8	21.2±2.3
S2S2	5	57.0±15.1	2:3	186±20	107±26	45±6	21.6±2.3
Diabetic group							
S1S1	10	57.9±12.4	6:4	205±26	148±54	44±8	21.1±3.0
S1S2	29	58.1±11.4	22:7	205±38	143±74	41±11	21.3±3.1
S2S2	10	60.0±12.7	7:3	203±37	140±49	43±13	23.1±4.9

症との関連を見い出せなかったとするもの^{35,37)}もありはつきりした結論を見るに至っていない。

今回の検討では日本人を対象としたものであるが P2 allele と冠動脈硬化症との関連は認められなかった。しかし、P2 allele を有する症例では P2 allele を有さない症例と比較して血清トリグリセリド濃度、肥満度において有意な高値を認め、HDL コレステロール濃度が低値傾向であった。Paulweber ら³⁵⁾も P2 allele を有する症例で HDL コレステロール濃度が低値であることを報告しており、P2 allele は動脈硬化症にかかりやすい性質を持つものと考えられよう。

一方、制限酵素 Sst I 切断によるアポ蛋白 AI-CIII 遺伝子の RFLP については、CIII 遺伝子の 3' 下流の 1塩基変異(シトシン→グアニン)により生ずる多型性でありアポ蛋白の蛋白構造に影響を及ぼさないもの⁴²⁾である。今回の成績では S2 allele の出現頻度が対照群0.50に比較して冠動脈硬化症を有する群で0.35と有意に少なかった。この結果は二つの点で興味深い。一つは S2 allele の出現頻度が欧米の報告と著しく異なる点である。S2 allele 出現頻度は日本人を対象とした今回の成績0.50, Satoh ら⁴¹⁾の成績0.34, 中国人を対象³⁹⁾とした成績0.475に対し、欧米での対照群における S2 allele 出現頻度は0.02ないし0.11に分布している(表8)。もうひとつ欧米においては S2 allele 出現頻度が冠動脈硬化症や冠動脈以外の動脈硬化症を有

する群に高いのに対し、今回の成績では冠動脈硬化症を有する群に少ない点である。これらの差異については Rees ら³⁹⁾が報告しているごとくこの RFLP に関する人種差を考えなくては説明ができないと思われる。

S2 allele が脂質レベルに及ぼす影響について血清トリグリセリド濃度を上昇させるとの報告^{35,36)}や、家族性複合型高脂血症の一部に S2 allele と連鎖したものがあつたため血清トリグリセリド濃度が上昇するという報告³⁴⁾がある。今回の成績では遺伝子型 S1S1, S1S2, S2S2 の3群間において脂質レベルに差異を認めなかった。前述のごとく日本人においてはこの RFLP に関する遺伝子型の分布同様、S2 allele の脂質濃度に及ぼす影響についても欧米と異なっているものと推定される。以上より日本人においては P2 allele を持つ症例、欧米とは逆に S1 allele を持つ症例で高脂血症、冠動脈硬化症を発症する可能性が高いと考えられる。

アポ蛋白 AI やアポ蛋白 CIII は末梢組織の遊離コレステロールをエステル化する際の補酵素であるレシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ (lecithin cholesterol acyltransferase, LCAT) の活性に影響を及ぼしていることからアポ蛋白 AI-CIII 遺伝子多型性と LCAT 活性の関連を検討した報告⁵²⁾がある。それによれば血漿コレステロール濃度が LCAT 活性と相関を示し、これらの RFLP と血漿コレステ

Table 8. Comparison of allelic frequencies obtained in previous studies and in this work

	No	P2 allele	S2 allele
Kessling ²⁷⁾	C 70	0.12	0.06
Ordovas ³²⁾	C 123	0.04	
	P 88	0.18	P < 0.0001
Ferns ³³⁾	C 52	0.07	0.02
	P 57	0.03	NS
Hyden ³⁴⁾	C 38	0.06	0.05
Paulweber ³⁵⁾	C 118	0.06	0.11
	P 106	0.03	NS
This study	C 64	0.09	0.50
	P 57	0.07	NS
Rees ³⁸⁾	C 68		0.04
	P 61		0.12
O'Connor ⁴⁰⁾	C 50		0.02
	P ^a 49		0.12
Satoh ⁴¹⁾	C 82		0.34
	P 69		0.32

P values are comparison between control and patient groups in each study. C, control group; P, patient group with coronary atherosclerosis; P^a, patients with extracoronary atherosclerosis; NS, not significant.

ロール濃度が関連していることから、これらの RFLP は二次的に LCAT 活性に及ぼしていると結論づけている。この他最近、HDL 代謝にコレステロール・エステル転送蛋白 (cholesterol ester transfer protein, CETP) の関与が明らかにされ、その構造遺伝子の異常から CETP の欠損症を生じ家族性高 HDL 血症を呈するホモ接合体症例^{53,54}が報告された。本症ヘテロ接合体において HDL 代謝異常が示唆されているが、今後は冠動脈硬化症に関連するアポ蛋白遺伝子多型性の研究に LCAT や CETP に関連した RFLP も含めた検討が必要になるとと思われる。

アポ蛋白 B-100 は LDL のアポ蛋白の大部分を占める主要構造蛋白で LDL リセプターのリガンドでもある⁵⁵。今回検討した制限酵素 Eco RI による RFLP は LDL リセプターとの結合部位の近傍でアポ蛋白 B-100 のアミノ酸配列に差異をもたらす多型性であり、抗原グループ (t/z) 多型性 [antigen group, Ag (t/z) polymorphism] とこの RFLP の一致⁵⁶が報告されていることから、アポ蛋白 B-100 の抗原性にも影響を及ぼしていると考えられる。欧米の報告では R2 allele の出現頻度が冠動脈硬化症や末梢動脈硬化症に高いと報告されている^{29,44,45}。今回の成績より日本人では R2 allele の出現頻度が冠動脈硬化症群でも対照群でも欧米の報告より低値であり、冠動脈硬化症との関連は否定的であり、この RFLP により冠動脈硬化症にかかりやすいグループを推定することは困難であると思われる。

一方、アポ蛋白 B-100 の制限酵素 Msp I による RFLP は 3' 下流の insertion-deletion polymorphism であり、アポ蛋白 B-100 の発現調節に関与していると推定されている⁴⁰。Hegele ら²⁹は M2 allele が冠動脈硬化症で有意に多いと報告しているが、今回の成績より日本人では M2 allele の出現頻度に関して冠動脈硬化症群、対照群間に有意差を認めず、冠動脈硬化症の遺伝的マーカーとして有用であるといえない。ただこの RFLP は 6 種類のグループに細分化される^{43,46}ことから家系調査には有用であると思われる。

最近アポ蛋白 B-100 遺伝子に関する数種類の RFLP を用いた 290 例の解析より血清総コレステロール濃度、冠動脈硬化症、肥満症とこれら RFLP の関連⁵⁰が報告された。それによれば、血清総コレステロール値の平均はアポ蛋白 B-100 のアミノ酸番号 3611 番 (Msp I による site polymorphism)/4154 番 (今回検討した Eco RI polymorphism) がアルギニン/リジンの場合 196mg/dl、アルギニン/グルタミン酸の場合 252 mg/dl であり、それらのヘテロ接合体ではその中間に

総コレステロールが位置するものである。しかし、アポ蛋白 AI-CIII 遺伝子に関する RFLP 同様、アポ蛋白 B-100 遺伝子に関する RFLP についても今回の成績や Aburatani ら⁵⁷の報告のように日本人においてはその分布が異なることから、この様な関連は認められないと思われる。

糖尿病はそれ自体冠動脈硬化症の危険因子である⁵⁸が、糖尿病に合併するリポ蛋白異常症も冠動脈硬化症を促進させると考えられる。糖尿病に合併するリポ蛋白異常症の原因は very low density lipoprotein (VLDL) の産生亢進、レムナントリポ蛋白の増加、LDL の非酵素的糖加反応による代謝の遅延など多様⁵⁹である。中でも、レムナントリポ蛋白はコレステロールに富んだ VLDL とともに生理的に存在する動脈硬化促進的リポ蛋白⁶⁰であり、その意義は重要である。糖尿病における冠動脈硬化症の特徴は、非糖尿病者の冠動脈硬化症と比較してその予後が良くないこと⁶¹や冠動脈以外の動脈硬化症を合併しやすいこと⁶²である。したがって糖尿病患者においては早期に動脈硬化症の発症しやすい遺伝的因子を検討することも重要である。

Trembath ら⁶³は糖尿病症例を対象にアポ蛋白 AI-CIII 遺伝子に関する RFLP を検討し、糖尿病に合併した高トリグリセリド血症の中には S2 allele と連鎖したものとがあると報告した。今回の成績では S2 allele ではなく、P2 allele に連鎖した高トリグリセリド血症を認め、糖尿病の存在がその傾向を顕著なものとしていた。P2 allele とリポ蛋白代謝異常症との関連は非糖尿病グループにおいても認められるが、糖尿病患者で増強されることから、糖尿病症例に合併するリポ蛋白代謝異常症の素因の一つとして意義があると思われる。

結 論

冠動脈硬化症症例 57 例、冠動脈硬化症を有しない対照群 64 例についてアポ蛋白 AI-CIII 遺伝子およびアポ蛋白 B 遺伝子に関する RFLP を検討し、以下の結果を得た。また、糖尿病症例 49 例と正脂血症対照者 32 例について同様の検討を行った。

1. 制限酵素 Pst I によるアポ蛋白 AI-CIII 遺伝子 RFLP で P2 allele の出現頻度は冠動脈硬化症群と対照群に有意差を認めなかった。P2 allele を有する症例では P2 allele のない症例と比較して血清トリグリセリド濃度、肥満度において有意に高値であった。

2. 制限酵素 Sst I によるアポ蛋白 AI-CIII 遺伝子 RFLP で S2 allele の分布は冠動脈硬化症群において対

照群より有意に少なかった。欧米の報告と比較してその関係は逆であること、両群とも S2 allele の出現頻度が低いことよりこの RFLP に関しての人種差が示唆された。

3. 制限酵素 Eco RI, Msp I によるアポ蛋白 B 遺伝子 RFLP では冠動脈硬化症やリポ蛋白代謝異常症との関連は認められなかった。

4. 対照群では P2 の有無で脂質レベルに差異を認めなかったが、糖尿病群では P2 を有する症例で血清総コレステロール濃度の有意な高値を認めた。従って糖尿病に合併するリポ蛋白代謝異常症にアポ蛋白 AI-CIII 遺伝子 RFLP の関与が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師竹田亮祐教授に深甚なる謝意を表わします。また、本研究を当初より直接御指導・ご教示頂きました金沢大学医学部内科学第二講座馬淵宏助教授に心から謝意を表わします。また多大なるご協力を頂きました金沢大学医学部第二内科第一研究室の各位に感謝いたします。統計学に関する御指導を頂きました金沢大学医学部衛生学講座橋本和夫教授、貴重な症例について御教示を賜った石川県立中央病院大家他喜雄副院長はじめ循環器グループの先生方に深謝致します。

尚、本研究の一部は第20回日本動脈硬化化学会総会、日本動脈硬化化学会昭和63年度冬期大会、第30回、第31回日本糖尿病学会総会、第32回日本糖尿病学会総会ワークショップにおいて発表した。

文 献

- 1) **Kannel, W. B. & Gordon, T.:** The Framingham Study: An epidemiological investigation of cardiovascular disease, Section 30. Some characteristics related to the incidence of cardiovascular disease and death: the Framingham Study. 18-year follow up. Washington, D. C., Dept. of Health, Education, and Welfare, Publication No. (NIH) 74-599 (1974).
- 2) **Lipid Research Clinics Program:** The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial Results, I. Reduction in incidence of coronary heart disease. *J. A. M. A.*, **251**, 351-364 (1984).
- 3) **Lipid Research Clinics Program:** The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial Results, II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *J. A. M. A.*, **251**, 365-374 (1984).
- 4) **Kane, J. P., Hardman, D. A. & Paulus, H. E.:** Heterogeneity of apolipoprotein B: Isolation of a new species from human chylomicrons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2465-2469 (1980).
- 5) **Brown, M. S. & Goldstein, J. L.:** Lipoprotein receptors in the liver: Control signals for cholesterol traffic. *J. Clin. Invest.*, **72**, 743-750 (1983).
- 6) **Knott, T. J., Rall, S. C., Innerarity, T. L., Jacobson, S. F., Urdea, M. S., Willson, B. L., Powell, L. M., Pease, R. J., Eddy, R., Nakai, H., Byers, M., Priestley, L. M., Robertson, E., Rall, L. B., Betsholtz, C., Shows, T. B., Mahley, R. W. & Scott, J.:** Human apolipoprotein B: Structure of carboxyl-terminal domains, site of gene expression, and chromosomal localization. *Science*, **230**, 37-43 (1985).
- 7) **Huang, L-S, Bock, S. C., Feinstein, S. I. & Breslow, J. L.:** Human apolipoprotein B cDNA clone isolation and demonstration that liver apolipoprotein B mRNA is 22 kilobases in length. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6825-6829 (1985).
- 8) **Law, S. W., Lackner, K. J., Hospattankar, A. V., Anchors, J. M., Sakaguchi, A. Y., Naylor, S. L. & Brewer, H. B. Jr.:** Human apolipoprotein B-100: Cloning, analysis of liver mRNA, and assignment of the gene to chromosome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 8340-8344 (1985).
- 9) **Huang, L-S., Miller, D. A., Bruns, G. A. & Breslow, J. L.:** Mapping of the APOB gene to chromosome 2p and demonstration of a two-allele restriction fragment length polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 644-648 (1986).
- 10) **Yang, C-Y., Chen, S-W., Gianturco, S. H., Bradley, W. A., Sparrow, J. T., Tanimura, M., Li, W-H., Sparrow, D. A., DeLoof, H., Rosseneu, M., Lee, F-S., Gu, Z-W., Gotto, A. M. Jr. & Chan, L.:** Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100. *Nature*, **323**, 738-742 (1986).
- 11) **Blackhart, B. D., Ludwig, E. M., Pierotti, V. R., Caiati, L., Onasch, M. A., Wallis, S. C., Powell, L., Pease, R., Knott, T. J., Chu, M-L., Mahley, R. W., McCarthy, B. J. & Wilson, B. L.:** Structure of the human apolipoprotein B gene. *J. Biol. Chem.*, **261**, 15364-15367 (1986).
- 12) **Powell, L. M., Wallis, S. C., Pease, R. J., Edwards, Y. E., Knott, T. J. & Scott, J.:** A

novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell*, **50**, 831-840 (1987).

- 13) **Hospattankar, A. V., Higuchi, K., Law, S. M., Meglin, N. & Brewer, H. B. Jr.**: Identification of a novel in-frame translational stop codon in human intestine apo B mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **148**, 279-285 (1987).
- 14) **Miller, G. J. & Miller, N. E.**: Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischemic heart disease. *Lancet*, **1**, 16-19 (1975).
- 15) **Breslow, J. L., McPherson, R. J., Williams, H., Kurnit, D., Nussbaum, A. L., Karathanasis, S. K. & Zannis, V. I.**: Isolation and characterization of cDNA clones for human apolipoprotein A-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6861-6865 (1982).
- 16) **Karathanasis, S. K., Zannis, V. I. & Breslow, J. L.**: Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-I gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6147-6151 (1983).
- 17) **Bruns, G. A. P., Karathanasis, S. K. & Breslow, J. L.**: Human apolipoprotein AI-CIII gene complex is located on chromosome 11. *Arteriosclerosis*, **4**, 97-102 (1984).
- 18) **Karathanasis, S. K., McPherson, J., Zannis, V. I. & Breslow, J. L.**: Linkage of human apolipoprotein AI and CIII genes. *Nature*, **304**, 208-204 (1983).
- 19) **Zannis, V. I., Karathanasis, S. K., Keutmann, G., Goldberger, G. & Breslow, J. L.**: Intracellular and extracellular processing of human apolipoprotein AI: Secreted apolipoprotein AI isoprotein 2 is a propeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2574-2578 (1983).
- 20) **Karathanasis, S. K.**: Apolipoprotein multi-gene family: Tandem organization of human apolipoprotein AI, CIII, AIV genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6374-6378 (1985).
- 21) **Mabuchi, H., Koizumi, J., Simizu, M., Takeda, R. & the Hokuliku FH-CHD Study Group**: Development of coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *Circulation*, **79**, 225-332 (1989).
- 22) **Hunt, S. C., Wu, L. L., Hopkins, P. N., Stults, B. M., Kuida, H., Ramiretz, M. E.,**

- Lalouel, J.-M. & Williams, R. R.**: Apolipoprotein, low density lipoprotein subfraction, and insulin associations with familial combined hyperlipidemia: Study of Utah patients with familial dyslipidemic hypertension. *Arteriosclerosis*, **9**, 335-344 (1989).
- 23) **Kajinami, K., Mabuchi, H., Itoh, H., Michishita, I., Takeda, M., Wakasugi, T., Koizumi, J. & Takeda, R.**: New variant of low density lipoprotein receptor gene: FH-Tonami. *Arteriosclerosis*, **8**, 187-192 (1988).
- 24) **Kostner, G. M. & Karadi, I.**: Lipoprotein alterations in diabetes mellitus. *Diabetologia*, **31**, 717-722 (1988).
- 25) **Vandenplas, S., Wild, I., Rabie, A., Brebner, K., Ricketts, M., Wallis, G., Bester, A., Boyd, C. & Mathew, C.**: Blot hybridization analysis of genomic DNA. *J. Med. Genet.*, **21**, 164-172 (1984).
- 26) **Southern, E.**: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
- 27) **Kessling, A. M., Horsthenke, B. & Humphries, S. E.**: A study of DNA polymorphisms around the human apolipoprotein AI gene in hyperlipidaemic and normal individuals. *Clin. Genet.*, **28**, 296-306 (1985).
- 28) **Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J.**: Transformation by the Calcium Chloride Procedure. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, first ed. p250-251, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- 29) **Hegele, R. A., Huang, L.-S., Herbert, P. M., Conred, B. B., Buring, J. E., Hennekens, C. H. & Breslow, J. L.**: Apolipoprotein B-gene DNA polymorphisms associated with myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.*, **315**, 1509-1515 (1986).
- 30) **Feinberg, A. P. & Vogelstein, B.**: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13 (1983).
- 31) 駒沢 勉, 橋口捷久: 第2類の BASIC プログラム, パソコン数量化分析, 第1版, 169-227頁, 朝倉書店, 東京, 1988.
- 32) **Ordovas, J. M., Schaefer, E. J., Salem, D., Ward, R. H., Glueck, C. J., Vergani, C., Wilson,**

- P. W. F. & Karathanasis, S. K.: Apolipoprotein AI gene polymorphism associated with premature coronary artery disease and familial hypoalphalipoproteinemia. *N. Engl. J. Med.*, **314**, 671-677 (1986).
- 33) Ferns, G. A. A. & Galton, D. J.: Haplotypes of the human apoprotein AI-CIII-AIV gene cluster in coronary atherosclerosis. *Hum. Genet.*, **73**, 245-249 (1986).
- 34) Hyden, M. R., Kirk, H., Clark, C., Frohlich, J., Rabkin, S., McLeod, R. & Hewitt, J.: DNA polymorphisms in and around the apo AI-CIII genes and genetic hyperlipidemias. *Am. J. Hum. Genet.*, **40**, 421-430 (1987).
- 35) Paulweber, B., Friedl, W., Krempler, F., Humphries, S. E. & Sandhofer, F.: Genetic variation in the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster and coronary heart disease. *Atherosclerosis*, **73**, 125-133 (1988).
- 36) Rees, A., Shoulders, C. C., Stocks J. & Galton, D. J.: DNA polymorphism adjacent to human apolipoprotein AI gene: Relation to hypertriglyceridemia. *Lancet*, **1**, 444-446 (1983).
- 37) Ferns, G. A. A., Stocks, J., Ritchie, C & Galton, D. J.: Genetic polymorphisms of apolipoprotein CIII and insulin in survivors of myocardial infarction. *Lancet*, **2**, 300-303 (1985).
- 38) Rees, A., Stocks, J., Williams, L. G., Caplin, J. L., Jowett, N. I., Camm, A. J. & Galton, D. J.: DNA polymorphisms in the apolipoprotein CIII and insulin genes and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **58**, 269-275 (1985).
- 39) Rees, A., Stocks, J., Sharpe, C. R., Vella, M. A., Shoulders, C. C., Katz, J., Jowett, N. I., Baralle, F. E. & Galton, D. J.: Deoxyribonucleic acid polymorphism in the apolipoprotein AI-CIII gene cluster: Association with hypertriglyceridemia. *J. Clin. Invest.*, **76**, 1090-1095 (1985).
- 40) O'Connor, G., Stocks, J., Lumley, J. & Galton, D. J.: A DNA polymorphism of the apolipoprotein CIII gene in extracoronary atherosclerosis. *Clin. Sci.*, **74**, 289-292 (1988).
- 41) Satoh, J., Hattori, N., Onuki, M., Yamanaka, K., Fujiwara, H., Amamiya, Y., Nagaoka, H., Sakuma, T., Yamanouchi, Y., Okafuji, T., Iwamura, Y., Tsuchiya, S., Fukutomi, H., Ohsuga, T. & Hamaguchi, H.: Apolipoprotein AI-CIII gene polymorphisms in Japanese myocardial infarction survivors. *Jpn. J. Hum. Genet.*, **32**, 15-20 (1987).
- 42) Karathanasis, S. K., Norum, R. A., Zannis, V. I. & Breslow, J. L.: An inherited polymorphism in the human apolipoprotein AI gene locus related to the development of atherosclerosis. *Nature*, **301**, 718-720 (1983).
- 43) Jenner, K., Sidoli, A., Ball, M., Rodriguez, J. R. Pagani, F., Giudici, G., Mann, J., Baralle, F. E. & Shoulders, C. C.: Characterization of genetic markers in the 3' end of the apo B gene and their use in family and population studies. *Atherosclerosis*, **69**, 39-49 (1988).
- 44) Monsalve, M. V., Young, R., Jobsis, J., Wiseman, S. A., Dhamu, S., Powell, J. T., Greenhalgh, R. M. & Humphries, S. E.: DNA polymorphisms of the gene for apolipoprotein B in patients with peripheral artery disease. *Atherosclerosis*, **70**, 123-129 (1988).
- 45) Myant, N. B., Gallagher, J., Barbir, M., Thompson, G. R., Wile, D. & Humphries, S. E.: Restriction fragment length polymorphisms in the apo B gene in relation to coronary artery disease. *Atherosclerosis*, **77**, 193-201 (1989).
- 46) Huang, L-S. & Breslow, J. L.: A unique AT-rich hypervariable minisatellite 3' to the apo B gene defines a high information restriction fragment length polymorphism. *J. Biol. Chem.*, **262**, 8952-8955 (1987).
- 47) Goldstein, J. L., Schrott, H. G., Hazzard, W. R., Bierman, E. L. & Motulsky, A. G.: Hyperlipidemia in coronary heart disease. II: Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J. Clin. Invest.*, **52**, 1544-1568 (1973).
- 48) Breslow, J. L.: Genetic basis of lipoprotein disorders. *J. Clin. Invest.*, **84**, 373-380 (1989).
- 49) Breslow, J. L.: Apolipoprotein genetic variation and human disease. *Physiol. Rev.*, **68**, 85-132 (1988).
- 50) Sidoli, A., Giudici, G., Soria, M. & Vergani, C.: Restriction-fragment-length-polymorphisms in the AI-CIII gene complex occurring in a family

with hypoalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis*, **62**, 81-87 (1986).

51) **Breslow, J. L.**: Familial disorders of high density lipoprotein metabolism. *In* Stanbury, J. B., Wyngarden, D. S., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th ed. p1251-1266, McGraw-Hill Book Co., New York, 1989.

52) **Kessling, A. M., Nanjee, M. N., Miller, N. E. & Humphries, S. E.**: Variations in the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene region and in lecithin: cholesterol acyltransferase concentration are determinants of plasma cholesterol concentrations. *Atherosclerosis*, **70**, 13-19 (1988).

53) **Koizumi, J., Mabuchi, H., Yoshimura, A., Michishita, I., Takeda, M., Itho, H., Sakai, Y., Sakai, K., Ueda, K. & Takeda, R.**: Deficiency of serum cholesteryl-ester transfer activity in patients with familial hyperalphalipoproteinaemia. *Atherosclerosis*, **58**, 175-186 (1985).

54) **Brown, M. L., Inazu, A., Hesler, C. B., Agellon, L. B., Mann, C., Whitlock, M. E., Marcel, Y. L., Milne, R. S., Koizumi, J., Mabuchi, H., Takeda, R. & Tall, A.**: Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature*, **342**, 448-451 (1989).

55) **Ma, Y., Schumaker, V., Butler, R. & Sparks, R. S.**: Two restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) associated with Ag (t/z) and Ag (c/g) antigenic sites of human apolipoprotein B. *Arteriosclerosis*, **7**, 301-305 (1987).

56) **Williams, J. R., Knott, T. J., Wallis, S. C., Sweetnam, P., Yarnell, J., Cox, N., Bell, G. I. & Miller, N. E.**: Variation of apolipoprotein-B

gene is associated with obesity, high blood cholesterol levels, and increased risk of coronary heart disease. *Lancet*, **2**, 1442-1446 (1988).

57) **Aburatani, H., Murase, T., Takaku, F., Itho, H., Matumoto, A. & Itakura, H.**: Apolipoprotein B-gene polymorphism and myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.*, **317**, 52-53 (1987).

58) **Kannel, W. B. & McGee, D. L.**: Diabetes and cardiovascular risk factors: The Framingham Study. *Circulation*, **59**, 8-13 (1979).

59) **Howard, B. V.**: Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *J. Lipid Res.*, **28**, 613-628 (1987).

60) **Tatami, R., Mabuchi, H., Ueda, K., Ueda, R., Haba, T., Kametani, T., Itoh, S., Koizumi, J., Ohta, M., Miyamoto, S., Nakayama, A., Kanaya, H., Oiwake, H., Genda, A. & Takeda, R.**: Intermediate-density lipoprotein and cholesterol-rich very low density lipoprotein in angiographically determined coronary artery disease. *Circulation*, **64**, 1174-1184 (1981).

61) **Singer, D. E., Moulton, A. W. & Nathan, D. M.**: Diabetic myocardial infarction: Interaction of diabetes with other preinfarction risk factors. *Diabetes*, **38**, 350-357 (1989).

62) **Brand, F. N., Abbott, R. D. & Kannel, W. B.**: Diabetes, intermittent claudication, and risk of cardiovascular events: The Framingham Study. *Diabetes*, **38**, 504-509 (1989).

63) **Trembath, R. C., Thomas, D. J. B., Hendra, T. J. & Galton, D. J.**: Deoxyribonucleic acid polymorphism of the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster and coronary heart disease in non-insulin-dependent diabetes. *Br. Med. J.*, **294**, 1577-1578 (1987).

Restriction Fragment Length Polymorphisms in Apolipoprotein genes in Coronary Heart Disease and Diabetes Mellitus Hideaki Itoh, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, 99, 463—478 (1990)

Key words coronary heart disease, restriction fragment length polymorphism, apolipoprotein AI, apolipoprotein B, diabetes mellitus

Abstract

The association of a high level of low density lipoprotein (LDL) and a low level of high density lipoprotein (HDL) with the incidence of coronary heart disease (CHD) is well established by epidemiological studies. Serum lipoprotein levels are under the influence of genetic factors. To clarify the genetic background concerned with the development of CHD, restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) of apolipoprotein AI (apoAI) and apolipoprotein B (apoB), the principal protein constituent of HDL and LDL, were analyzed by Southern blotting, in 57 patients with myocardial infarction (MI) and 64 controls. After Pst I digestion, allele P1 (2.2kb) and P2 (3.3kb) were detected by the apoAI gene probe. There were no significant differences in the genotype distribution between the controls and patients with MI. The triglyceride levels in cases of genotype P1P2 were significantly higher than those of genotype P1P1. After Sst I digestion, allele S1 (4.5kb, 5.7kb) and S2 (3.2kb, 5.7kb) were detected. The genotype distribution in the control group was S1S1 14, S1S2 36, S2S2 14 and in the patient group, S1S2 20, S1S2 34, S2S2 3, respectively. The incidence of allele S2 in the patient group is significantly lower than in the control group. It is considered that individuals with allele S2 have a tendency to avoid MI. Unlike the previous reported distribution of S2 allele in Caucasians, the incidence is higher in the Japanese. This difference may be due to a racial difference in Sst I RFLP of apoAI gene between Caucasians and Japanese. Using the 3' end of the apoB gene cDNA, allele R1 (11kb) and R2(13kb) with Eco RI digestion, and allele M1 (<2.5kb) and M2 (\geq 2.5kb) with Msp I digestion were detected. There was no association between these RFLPs and MI. To elucidate the influence of these four RFLPs on lipoprotein metabolism in diabetic patients, who have been known to have various dyslipoproteinemias, 49 non-insulin dependent diabetics and 32 normolipidemic controls were analyzed. In the diabetic group, the serum total cholesterol levels in P1P2 cases were significantly higher than those in P1P1 cases, although the lipid levels were similar in the two groups with or without P2 allele in normolipidemic controls. A Pst I RFLP may relate to hypercholesterolemia in diabetic patients. It is concluded that RFLPs in the apolipoprotein AI gene are useful as an indicator of the genetic factor for dyslipoproteinemias in CHD and in diabetes mellitus.