

ヘテロ接合体性家族性高コレステロール血症とコレステリルエステル転送蛋白欠損症の合併例の血清リポ蛋白および臨床像に関する研究

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/2297/9127

ヘテロ接合体性家族性高コレステロール血症と コレステリルエステル転送蛋白欠損症の合併例の 血清リポ蛋白および臨床像に関する研究

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 馬淵 宏教授)

原 城 達 夫

低比重リポ蛋白コレステロール (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) の高値は冠動脈硬化性心疾患 (coronary heart disease, CHD) の危険因子であり, 高比重リポ蛋白コレステロール (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) の高値 (60mg/dl 以上) は CHD の負の危険因子である. コレステリルエステル転送蛋白欠損症 (cholesteryl ester transfer protein deficiency, CETP-D) は高 HDL コレステロール血症の遺伝的成因である. 一方, 家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia, FH) は低比重リポ蛋白レセプター (low density lipoprotein receptor, LDL-R) の遺伝子異常により起こる高 LDL コレステロール血症であり, 早発性 CHD と強い関連がある. ヘテロ接合体性 FH 症例288家系において, コレステリルエステル転送蛋白 (cholesteryl ester transfer protein, CETP) 遺伝子のイントロン14のスプライス異常 (Int14A, イントロン14の5'末端の G→A への点異変), エキソン15のミスセンス変異 (D442G, エキソン15のアスパラギン酸からグリニンへの変異) の変異接合体頻度はそれぞれ, 0.3%, 3.0% であった. CETP 欠損を少なくとも1例を含むヘテロ FH 16家系のうち, CETP 欠損を伴わないヘテロ FH 12例, CETP 欠損を伴ったヘテロ FH 20例, 家系内正常5例の HDL-C 値はそれぞれ, 46 ± 3 mg/dl ($\bar{x} \pm \text{SEM}$), 60 ± 3 mg/dl, 50 ± 6 mg/dl で CETP 欠損を伴ったヘテロ FH で高値を認め ($p < 0.05$), LDL-C 値はそれぞれ, 288 ± 21 mg/dl, 252 ± 16 mg/dl, 131 ± 6 mg/dl で CETP 欠損を伴ったヘテロ FH で軽度低値を認めた. CETP 欠損を伴ったヘテロ FH の血清リポ蛋白組成は CETP 欠損を伴わないヘテロ FH に対して相対的に抗動脈硬化的であることが示唆された. しかし, CETP 欠損を伴ったヘテロ FH 22例中2例に心筋梗塞の合併を, 5例に狭心症あるいは冠動脈疾患の合併を認めた. 以上より, ヘテロ接合体性 CETP 欠損症でみられる高 HDL コレステロール血症の抗動脈硬化性は, FH による著明な高 LDL コレステロール血症が共存した場合, 冠動脈硬化性心疾患の発症の防止には不十分であると考えられた.

Key words familial hypercholesterolemia, cholesteryl ester transfer protein deficiency, double heterozygote, high density lipoprotein cholesterol, coronary heart disease

低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) は動脈硬化に促進的なりポ蛋白であり, 高比重リポ蛋白 (high density lipoprotein, HDL) は抗動脈硬化的なりポ蛋白である. LDL は, コレステロール (cholesterol, CHOL) を肝より末梢細胞へ運搬し, 逆に, HDL は CHOL を末梢細胞から肝へ戻す役割 (CHOL 逆転送系) を有する. HDL は粒子サイズにより, 大きくて低比重の HDL₂ (比重 1.063-1.125), 小さくて高比重の HDL₃ (比重 1.125-1.21) に分けられる. HDL はリポ蛋白粒子表面に CHOL, リン脂質 (phospholipid, PL), リポ蛋白粒子核にトリグリセライド (triglyceride, TG), コレステリルエステル (cholesteryl ester, CE) を含有する. その主要な構成アポ蛋白は, アポ蛋白 A-I, アポ蛋白 A-II, アポ蛋白 E, アポ蛋白 C-II, アポ蛋白 C-III である. アポ蛋白 E はキロミクロン (chylomicron) や超低比重リポ蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) の遺残物のリガンドであり, アポ蛋白 C-II はリポ蛋白リパーゼ (lipoprotein lipase, LPL) の活性化に働き, アポ蛋白

C-III はリポ蛋白水解を抑制する. さらに, CHOL をエステル化す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) や LCAT で生成された HDL (HDL₂) の CE を VLDL の TG と交換し, 全体的として HDL から VLDL-IDL-LDL 経路へ CE を供給するコレステリルエステル転送蛋白 (cholesteryl ester transfer protein, CETP) などが存在する^{1)~3)}. ヒト CETP は分子量 74KDa の糖蛋白であり, 非極性物質 (CE, TG) と PL の転送をつかさどる⁴⁾. その遺伝子は第16染色体長腕で LCAT 遺伝子の近傍に存在し, 16個のエキソンからなり全長 25K 塩基対 (base pair, bp) におよぶ. CETP 欠損症は, この CETP を介した CE の転送が阻止され, HDL に CE が蓄積された病態である.

血清高比重リポ蛋白コレステロール (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 値は, 薬物, 環境因子 (アルコール, 喫煙, 肥満, 運動など)^{5)~9)} の他に遺伝子異常¹⁰⁾, 遺伝的素因によって増減する. それぞれの因子は, LPL, 肝性リパーゼ (hepatic

平成6年12月15日受付, 平成7年2月16日受理

Abbreviations: ACAT, acyl-CoA: cholesterol acyltransferase; Asp, aspartic acid; bp, base pair; CE, cholesteryl ester; CETP, cholesteryl ester transfer protein; CETP-D, cholesteryl ester transfer protein deficiency; CHD, coronary heart disease; CHOL, cholesterol; CSI, coronary stenosis index; DNTB,

triglyceride lipase, HTGL), LCAT, CETP 活性を変化させ HDL の CE/TG 量を規定し, 粒子サイズやアポ蛋白 A-I および A-II の代謝速度を決定する。

先に, Inazu らは CETP 遺伝子のイントロン (intron, Int) 14 のスプライス異常 (GT→AT への点変異, Int14A) およびエキソン (exon) 15 のコドン442のアスパラギン酸 (aspartic acid, Asp, D) からグリシン (glycine, Gly, G) へのミスセンス変異 (D442G) による CETP 欠損症は家族性高 HDL-C 血症の成因であり, 日本人に比較的高率に認められる変異^{11)~13)}であることを報告した。その血清 HDL-C 値は, Int14A 変異のホモ接合体で平均 158mg/dl, ヘテロ接合体で平均 69mg/dl, D442G 変異のホモ接合体で平均 86mg/dl, ヘテロ接合体で平均 91mg/dl であった¹³⁾。CETP 欠損により VLDL, キロミクロン遺残物, および LDL 中の CE 量は減少し, HDL 中の CE 量は増加する¹⁴⁾。その点で CETP 欠損によるリポ蛋白組成は抗動脈硬化的と考えられた。

一方, 家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia, FH) は LDL 受容体 (LDL receptor, LDL-R) 異常により著明な高低比重リポ蛋白コレステロール (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 血症を呈し, 腱黄色腫, 早発性冠動脈硬化症を特徴とする常染色体優性遺伝疾患である¹⁵⁾¹⁶⁾。LDL-R は839個のアミノ酸からなる一本鎖の糖蛋白で, その遺伝子は第19番染色体の短腕近位部に存在し, 18個のエキソンからなり全長 45Kbp に及ぶ¹⁵⁾。FH の血清 CHOL 値はホモ接合体で正常者の約4倍, ヘテロ接合体で約2倍を呈し, ホモ FH は幼少時からの高 CHOL 血症の持続により, ヘテロ FH より臨床症状の発現が早く重症である。ヘテロ FH 患者の約65%, ホモ FH はほぼ全例冠動脈疾患で死亡する¹⁷⁾。また, ホモ FH の発生頻度は10万人に1人と推定され比較的可成な疾患であるが, ヘテロ FH の発生頻度は500人に1人と比較的高率に認められ, 高 LDL 血症と冠動脈硬化症との密接な関係を示唆するモデル疾患である¹⁸⁾。

血清 HDL-C 値と虚血症心疾患との負の関係は, 本邦を含め¹⁹⁾欧米などの²⁰⁾数多くの疫学調査で報告されている。しかしながら, 高 LDL-C 血症と高 HDL-C 血症が併存した場合の動脈硬化惹起性についての報告は乏しい。本研究は, 高 LDL-C 血症を特徴とするヘテロ接合体性 FH と, 高 HDL-C 血症を特徴とするヘテロ接合体性 CETP 欠損の合併症の血清リポ蛋白組成の特徴と臨床像の検討により, CETP の低下が, 高 LDL-C 血症の動脈硬化進展に及ぼす影響を研究したものである。

対象および方法

1. 対象

一般健康男性236名, および FH の診断基準をみたした, ヘテロ接合体性 FH 288家系を対象とした。FH の診断基準は, 馬淵らの診断基準²¹⁾, すなわち, 1) 血清総コレステロール 230mg/dl 以上で腱黄色腫を認めること, 2) 一親等内に本症があり, 血清総コレステロール 230mg/dl 以上であること, のいずれかを満足するものとした。質問により, 年齢, 喫煙歴 (喫煙本数10本/日以上, あるいはそれ以下) を聴取し, 肥満は標準

体重の10%以上とした。標準体重は (身長-100)×0.9 により計算した。糖尿病は空腹時血糖値 140mg/dl 以上とし, 高血圧症は降圧剤の服用者, あるいは収縮期血圧 160mmHg 以上, あるいは拡張期血圧 95mmHg 以上とした。アキレス腱黄色腫は X 線検査により腱厚を定量化した。また, 冠動脈造影施行例に対しては, アメリカ心臓学会の定義により分類された15の冠動脈枝それぞれに対する狭窄度を, 狭窄度に応じて0から4までスコア化し, その合計を冠動脈狭窄度指数 (coronary stenosis index, CSI) とした¹⁸⁾。

II. 方法

1. 血清脂質およびアポ蛋白の測定

12時間以上の絶食の後, 早朝空腹時に採血し血清を得た。血清脂質値は, 少なくとも4から8週間血清脂質に影響する薬剤を服用していない状況にて採取した。血清 CHOL, TG は酵素法で²²⁾²³⁾, HDL-C はヘパリン CaCl₂ 沈殿法で²⁴⁾測定した。LDL-C は Friedewald の式 (LDL-C=CHOL-HDL-C-TG/5) より算出した²⁵⁾。アポ蛋白 (A-I, A-II, B, C-II, C-III, E) は免疫比濁法 (immunoturbidimetry, TIA) で²⁶⁾測定した。リポ蛋白 (a) (lipoprotein (a), Lp (a)) は ELISA 法で測定した²⁷⁾。HDL₂/HDL₃比は血漿 20μl をズダンブラック B で暗室で室温1時間, 次いで4℃で一晩前染色した後²⁸⁾, 4-30% 未変性ポリアクリルアミドゲル (Pharmacia, Uppsala, Sweden) で泳動した。泳動条件は, 90mM Tris-HCl, 80mM boric acid, 3mM EDTA, pH8.35 緩衝液中で 125V で30分間, 250V で16時間10℃で泳動した。泳動後, デンシトメトリスキャナー CS-9000 型 (島津, 京都) で濃度を計測し, 10nm の粒子径で HDL₂ と HDL₃ をわけた後, 密度計測した。

2. DNA 解析

1) CETP 遺伝子異常 (イントロン14の GT→AT 変異 (Int14A), およびエキソン15の D442G 変異) のスクリーニング
高分子 DNA は, トライトン X-100 融解変法²⁹⁾により, EDTA-2Na で採血した 10ml の末梢静脈血の白血球より抽出した。すなわち, 320mM ショ糖液, 1% トライトン X-100, 5mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl, pH7.6 を含む融解液にて白血球を溶血させ, 遠心により沈殿として白血球を集めた。これをプロテインナーゼ K (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) にて消化後, フェノール:クロロホルム (1:1) にて1回, 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, 最後にエタノール沈殿を行った。こうして得られた DNA を 10mM Tris-HCl 1mM EDTA-2Na, pH8.0 に溶解し, 260nm における吸光度測定により濃度を求めた。

イントロン14の GT→AT 変異は, イントロン13に存在する塩基配列, 14IA (5'-AGC ATC TGC CTT GTG GGT-3') と, イントロン14の塩基配列に一塩基人工変異 (A→T) を挿入した 14IB29 (5'-CAC CCA GTT TCC CCT CCA GCC CAC ACA TA-3') の2種類のプライマーを用い, エキソン14を含む 166bp の DNA をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) にて増幅した^{11)~13)}。反応系は, 1μg の DNA を鋳型として, 50pmol の各プライマー, 各 200μmol のデオキシヌクレオチド (dGTP, dATP, dCTP, TTP), 2.5単位の Taq DNA ポリメラーゼ

dithionitrobenzoic acid; FH, familial hypercholesterolemia; Gly, glycine; HDL, high density lipoprotein; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; HTGL, hepatic triglyceride lipase; IDL, intermediate density lipoprotein; Int, intron; LCAT, lecithin cholesterol acyltransferase; LDL, low density lipoprotein; LDL-C, low

(Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, USA), 10mM Tris-HCl, pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01% ゼラチンからなり、ミネラルオイル (Sigma, St. Louis, USA) を加えた。反応条件としては、94°C30秒, 55°C60秒, 72°C90秒で30サイクルで増幅した。増幅された 166bp の DNA 断片を、*Nde*I 制限酵素 (GIBCO-BRL, Gaithersburg, USA) で37°Cで3時間消化し、3.0%の低融点アガロースと通常のアガロースを 3:1 で混合したゲル (Nusieve, FMC BioProducts, Rockland, USA) で 89mM Tris-HCl, 89mM boric acid, 2mM EDTA, pH8.0 (Tris-Boric acid-EDTA, TBE) 泳動用緩衝液中で泳動した。分子量マーカー (ϕ X174 二本鎖 DNA を *Hae*III 制限酵素で消化したもの: 東洋紡, 東京) も同時に泳動し、エチジウムブロマイド染色し断片長を確認した。正常例では *Nde*I 制限酵素で切断されないで、元の PCR 産物と同じ長さの 166bp の DNA 断片のみ認めるのに対し、変異をもつ産物はこの酵素で切断され 138bp の DNA 断片を与える。138bp 断片のみ認められるものをホモ接合体性 CETP 欠損, 166bp と 138bp の両方を認めるものをヘテロ接合体性 CETP 欠損と同定した (図1)。また変異が確認された後、プライマー 14IA とイントロン14の正常対立遺伝子 (G 接合子) を認識するプライマー 14IBGT (5'-CAC CCA GTT TCC CCT CCA GCC CAC ACG TA-3') の2種類のプライマーを用いて確認の PCR を行い、*Rsa*I 制限酵素 (和光, 大阪) で37°Cで3時間消化した。この場合では、正常例では *Rsa*

I 制限酵素で切断された 138bp の DNA 断片のみ認め、切断されない元の PCR 産物と同じ大きさの 166bp の DNA 断片のみ認めるものをホモ接合体性 CETP 欠損, 両方を認めるものをヘテロ CETP 欠損と同定した。

エクソン15のミスセンス変異 (D442G) も同様に PCR 制限酵素切断多型法 (PCR restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) にて同定した¹¹⁻¹³。プライマーは、エクソン15のミスセンス変異 (G接合子) を認識する E15A (5'-AGC AAA GGC GTG AGC CTC TCC G-3') とイントロン15の 15IB (5'-AGG AGG GAG CCA AGC TGG TAG A-3') の2種類のプライマーを用いて同様の条件で PCR を行い、*Msp*I 制限酵素 (和光) で37°Cで3時間消化後、前述のごとく泳動、染色し断片長を確認した。正常例では *Msp*I 制限酵素で切断されない元の PCR 産物と同じ大きさの 179bp の DNA 断片のみ認め、切断された 158bp の DNA 断片のみ認められるものをホモ接合体性 CETP 欠損, 両方を認めるものをヘテロ接合体性 CETP 欠損と同定した。また変異が確認された後、エクソン15の正常対立遺伝子 (A接合子) を認識するプライマー E15AA (5'-AGC AAA GGC GTG AGC CTC GTC G-3') と 15IB の2種類のプライマーを用いて確認の PCR を行い、*Sal*I 制限酵素 (宝酒造, 京都) で37°Cで3時間消化した。この場合では、正常例では *Sal*I 制限酵素で切断された 158bp の DNA 断片のみ認め、切断されない元の PCR 産物と同じ大きさの 179bp の DNA 断片

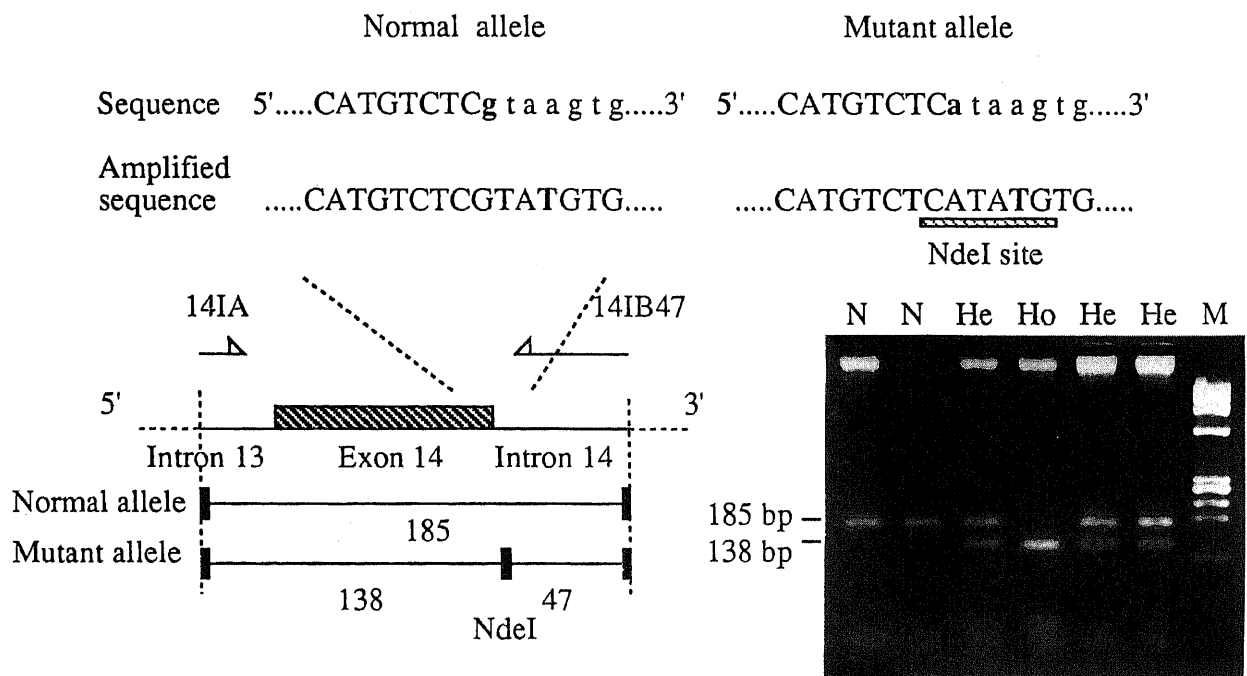


Fig. 1. Primer-mediated restriction map modification of PCR products used to screen for the intron 14 splicing donor site mutation (GT-AT). Using a mutagenic primer 14IB47 and a reverse primer 14IA, gene amplification by PCR introduced an artificial *Nde*I site in the PCR product only for the G-to-A mutated allele, generating two fragments of 138 bp and 47 bp on digestion with *Nde*I. Heterozygotes show double band of 185 bp and 138 bp. To confirm the homozygosity or heterozygosity in the region of interest, the other PCR-based assay was also carried out with a mutagenic primer 14IBGT and the 14IA primer which create a *Rsa*I site in the PCR products for the normal allele for intron 14 splicing donor site. N, normal; Ho, homozygote; He, heterozygote; M, the molecular size marker of ϕ X174 ds DNA digested with *Hae*III.

density lipoprotein cholesterol; LDL-R, low density lipoprotein receptor; Lp (a), lipoprotein (a); LPL, lipoprotein lipase; PL, phospholipid; RFLP, restriction fragment length polymorphism; RIA, radioimmunoassay; TBE, Tris-boric acid-EDTA; TG, triglyceride; VLDL, very low density lipoprotein

のみ認めるものをホモ接合体性 CETP 欠損, 両方を認めるものをヘテロ CETP 欠損と同定した (図 2)。

2) アポリポ蛋白 E 遺伝型の同定

アポ E は, 分子量 34KDa の蛋白であり, リポ蛋白粒子の構造の安定化, 様々なリポ蛋白代謝の調節に関わる^{30,31)}。その遺伝子はアポ C-II, C-III 遺伝子と同様に第19染色体に存在し, 4 個のエキソンからなり299個のアミノ酸から構成される。主に 3 対の対立遺伝子 ($\epsilon 2, \epsilon 3, \epsilon 4$) により, その荷電の違いにより E2, E3, E4 の表現型にわけられる。アポ E の野生型は E3 であり, 112, 158 番目のアミノ酸がそれぞれアルギニン (arginine, Arg), システイン (cystein, Cys) である。E2 は112, 158 番目のアミノ酸がともに Cys であり, E4 は112, 158 番目のアミノ酸がともに Arg である。アポ E 遺伝子の中央部, 140-160 番目のアミノ酸はアルギニン, リジンに富み, LDL-R との結合部位として重要である³²⁾。アポ E 遺伝型の同定は, PCR-RFLP 法³³⁾にて行った。すなわち, F4 (5'-ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC-3') と F6 (5'-TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A-3') の 2 種類のプライマーを用い, Apo E 遺伝子の112, 158 アミノ酸を含む, 244bp の DNA を PCR にて次の条件で増幅した。PCR の条件は, 1 μ g の鋳型 DNA を, 各プライマー 50pmol, 10% dimethyl sulfoxide (DMSO), 10mM Tris-HCl, pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01% ゼラチンの

存在下で95°Cで5分変性させた後, 各200 μ mol のデオキシヌクレオチド (dGTP, dATP, dCTP, TTP), 2.5 単位の Taq DNA ポリメラーゼを加え, 96°C 1分, 60°C 1分, 70°C 2分で30サイクル, ミネラルオイル存在下で増幅した。増幅された244bp の DNA 断片を, *Hha*I (和光) 制限酵素で37°Cで3時間消化し, 10-20% ポリアクリルアミドゲル (アトー, 東京) を用いて TBE 緩衝液中で125V で150分泳動, エチジウムブロマイド染色し断片長を確認した (図 3)。

3. CETP 蛋白量および活性の測定

ヒト CETP の C 末端25 アミノ酸を認識する I²⁵ で標識したモノクローナル抗体 TP2 を用いてラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA) 固相法³⁴⁾により, 血漿 CETP 蛋白量を測定した。

CETP 活性は, ³H-コレステリルリノリエンイト (NEN Research Products, Boston, USA) で CE を標識した HDL₃ から LDL への CE の転送量より測定した³⁵⁾。

1) ³H-CE-HDL₃ の作成

250 μ Ci ³H-コレステリルリノリエンイト, 4.66 μ mol 無脂肪酸卵黄フォスファチジルコリン (Sigma), 22nmol ブチルヒドロキントルエンを30秒間2回氷温で超音波ホモジナイザー Model 200 (Branson, Danbury Conn, USA) を用いて粉碎した。標識された脂質, 血清 (比重>1.125g/ml) 50ml, LCAT 阻害剤 (1.4mM

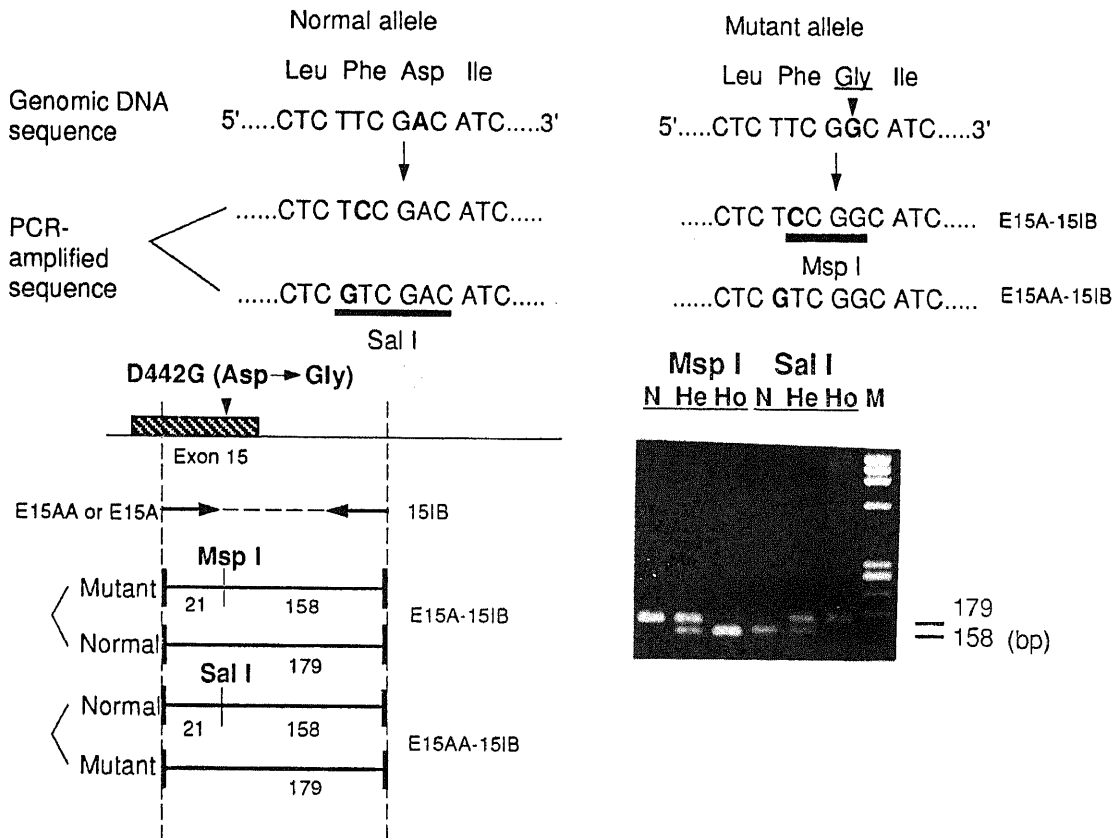


Fig. 2. Rapid detection method for an exon 15 missense mutation (D442G) employing the mutagenic primer-mediated restriction map modification. Using a mutagenic primer E15A and a reverse primer 15IB, gene amplification by PCR introduced an artificial *Msp*I site in the PCR product only for the A-to-G mutated allele (D442G). Digestion of the PCR products with *Msp*I generates polymorphic restriction fragments of 176 bp and/or 158 bp. Heterozygotes show double band of 176 bp and 158 bp. To confirm the homozygosity or heterozygosity in the region of interest, the other PCR-based assay was also carried out with a mutagenic primer E15AA and the 15IB primer which create a *Sal*I site in the PCR products for the normal allele for codon 442. N, normal; Ho, homozygote; He, heterozygote; M, the molecular size marker of ϕ X174 ds DNA digested with *Hae*III.

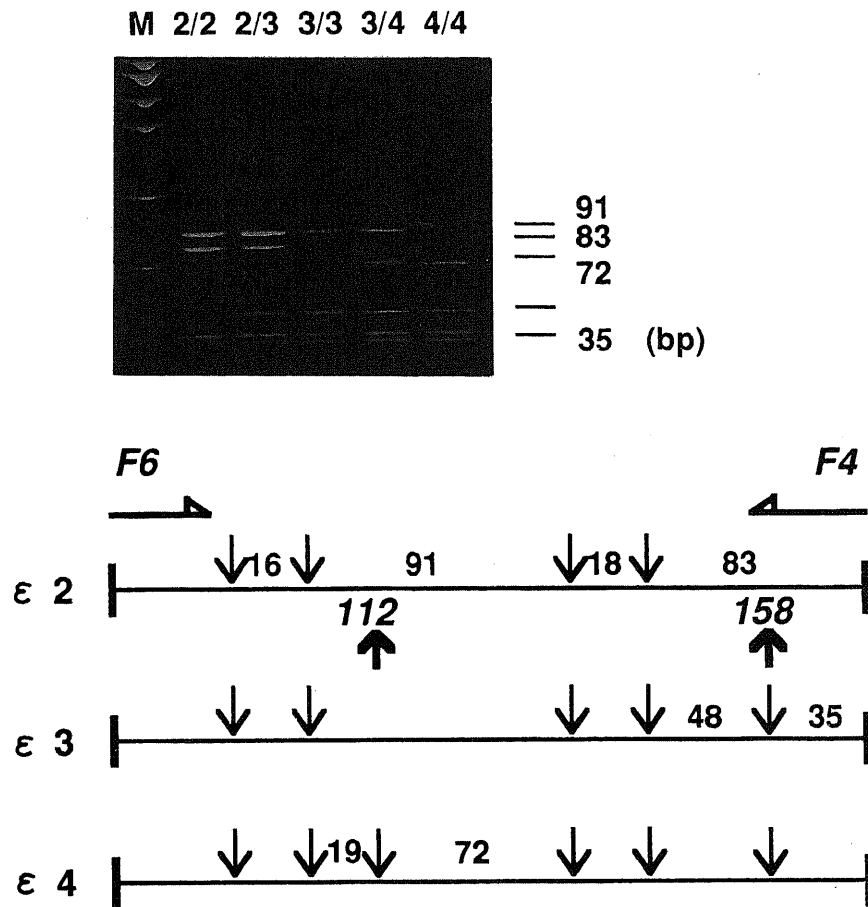


Fig. 3. Apolipoprotein E genotype determined by *Hha*I digestion of the PCR products. At the top, a 244 bp of PCR-amplified fragment using a primer F4 and a F6 primer contained the two polymorphic sites (codon 112 and 158). The fragments were digested by *Hha*I, and the restriction fragments were resolved on a 10–20% polyacrylamide gradient gel. Below the gel is shown *Hha*I restriction map for three common apolipoprotein E alleles. *Hha*I cleavage sites are indicated by arrows. Bold upward arrows indicate the polymorphic cleavage sites. M, the molecular size marker of ϕ X174 ds DNA digested with *Hae*III.

Table 1. Allele frequency of CETP deficiency in unrelated heterozygous FH subjects and general Japanese men

Group	Number of subjects	Number of homozygotes (M/F)	Number of heterozygotes (M/F)	Total mutated allele number (Number/2N)	Mutated allele frequency (%) (95% CI)
Heterozygous FH subjects	288				
CETP deficiency (Int14A)		0	2 (2/0)	2/576	0.3 (0.1–1.1)
CETP deficiency (D442G)		1 (0/1)	15 (10/5)	17/576	3.0 (1.9–4.4)
General Japanese men	236				
CETP deficiency (Int14A)		0	4	4/472	0.9 (0.3–1.9)
CETP deficiency (D442G)		0	16	16/472	3.4 (2.3–5.1)

Int 14A, an intron 14 splicing defect of the CETP gene; D442G, a missense mutation (Asp to Gly at the codon 442) in exon 15; CI, confidence intervals; M, male; F, female. 2N indicates the number of chromosomes analysed.

Table 2. Allele frequency of apolipoprotein E in heterozygous FH subjects with or without CETP-D

Group	Number of subjects	Frequency (%) of Apo E allele with		
		ϵ 2	ϵ 3	ϵ 4
FH	99	5.6	80.8	13.6
FH+CETP-D	19	8.8	76.4	14.7

dithionitrobenzoic acid, DNTB) を窒素ガス下で37℃16時間反応させた。その後、超遠心機 L8-55 およびローター 50.3Ti (Beckman, California, USA) を用いた超遠心法にて HDL₃ 分画を得た。HDL₃ 分画は 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 2mM EDTA, pH7.4 反応緩衝液中で透析した。

2) CETP 活性の測定

CETP の媒体として、10倍希釈した 40μl の患者血清を用いた。患者血清に、超遠心法で得た 250μg CHOL を含む LDL (1.019<比重<1.063), ³H-CE-HDL₃ (10-20nmol), 1.4mM DNTB を加え、さらに 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 2mM EDTA, pH7.4 反応緩衝液を加え 500μl とし、37℃で3時間振とう反応させた。反応は氷温下30分で停止させた。次いで、50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 2mM EDTA, pH7.4 反応緩衝液

を 500μl 加え希釈し、350μl のヘパリン-MnCl₂-牛血清アルブミン溶液 (ヘパリン1万単位, 2M MnCl₂, 20% 牛血清アルブミンを 1:1:4 で混合) にて、アポB含有リポ蛋白質を沈殿させ、HDL 分画の放射活性を液体シンチレーションカウンター LSC-703 型 (アロカ, 東京) で測定し、反応前との差 (dpm) を求め活性とした。なお転送活性は3回測定した。この系では、全体の放射活性の約30%以下の直線の転送反応が得られた。さらに、RIA 法で測定した CETP 蛋白質 (μg) で CETP 活性を除いて比活性を算出した³⁶⁾。

4. 統計処理

X²検定により、ヘテロ FH 群, CETP 欠損合併群の観察度数の確率を検定した。血清脂質, アポ蛋白, 転送蛋白値に関して一元配置分散分析 (one way analysis of variance, ANOVA) を

Table 3. Lipoprotein lipids in heterozygous male FH subjects among Apo E genotypes

Apo E genotype	Number of subjects	CHOL (mg/dl)	TG (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	II b Phenotype (%)
ε 2/3	6	362±20	160±37	275±21	55±4	* 33.3
ε 3/3	44	320±9	158±14	247±9	42±2	
ε 3/4	15	349±13	200±29	265±13	44±3	

All values are Mean±SEM. CHOL, total cholesterol; TG, triglyceride; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol (calculated by Friedewald formula); HDL-C, high density lipoprotein cholesterol. Type II b phenotype were defined as if triglyceride levels were above 180 mg/dl. * p<0.05 by ANOVA.

Table 4. The levels of serum lipids, lipoproteins and apolipoproteins in 16 heterozygous FH families

Group	Number of individuals (M/F)	Age (yr)	CHOL (mg/dl)	TG (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	Apo A-I (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo E (mg/dl)
Heterozygous FH	12 (6/6)	38±4	364±18	146±28	288±21	46±3	126±8#	179±16#	7.6±1.0#
Heterozygous FH+CETP-D	20 (14/6)	42±4	332±15**	112±12	252±16**	60±3*	133±8†	157±14†	5.8±0.5†
Unaffected members	5 (2/3)	33±14	199±3**	91±26	131±6**	50±6	122±17§	82±6§	4.6±0.9§

All values are Mean±SEM. CETP-D, CETP deficiency; NS, not significant. CHOL, total cholesterol; TG, triglyceride; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol (calculated by Friedewald formula); HDL-C, high density lipoprotein cholesterol. #, Number of individuals examined, 8; †, Number of individuals examined, 15; §, Number of individuals examined, 3. * p<0.05, ** p<0.01.

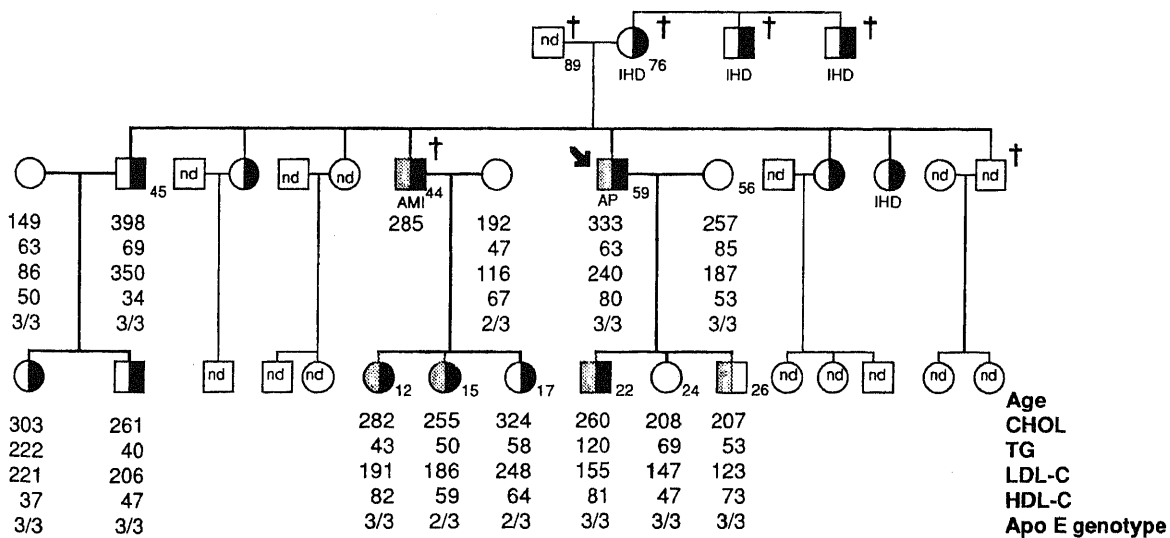


Fig. 4. Pedigree of the YK family. A plus sign denotes a deceased family member. The arrow indicates the proband. Lipoprotein levels are shown by mg/dl. Apolipoprotein E genotype were determined by the PCR-based method. nd, not determined; IHD, ischemic heart disease; AMI, acute myocardial infarction; AP, angina pectoris. ●, FH heterozygote; ■, CETP deficiency heterozygote (Int14A); ○, Normal.

行い、各群間の有意差比較を行った。

成 績

I. ヘテロ FH における CETP 欠損症の頻度

ヘテロ FH 288家系中にイントロン14の GT→AT 変異 (Int14A) のヘテロ接合体を2家系、エクソン15のミスセンス変異 (D442G) ホモ接合体を1家系、ヘテロ接合体を15家系に認めた。ヘテロ FH における Int14A と D442G の CETP 遺伝子異常の変異接合体頻度はそれぞれ、0.3%と3.0%に認められ、健康一般男性236名における一般人の推定頻度 (Int14A 0.9% D442G 3.4%) と同頻度に認められた (表1)。

II. ヘテロ FH におけるアポE遺伝型の頻度と血清脂質組成

ヘテロ FH 99家系における、PCR 法にて得られたアポE遺伝型の ε2, ε3, ε4 接合体の頻度はそれぞれ5.6%, 80.8%, 13.6%であった (表2)。一方、ヘテロ FH と CETP 欠損合併17家系における ε2, ε3, ε4 接合体の頻度はそれぞれ8.8%, 76.4%, 14.7%であり、CETP 欠損の合併を認めないヘテロ FH との差は認めなかった。

ヘテロ FH 男性例における ε2/3群, ε3/3群, ε3/4群における血清 LDL-C 値はそれぞれ平均 275±21mg/dl (\bar{x} ±SEM), 247±9mg/dl, 265±13mg/dl であり有意ではないが ε3/3群に比し ε3/4群, ε2/3群で高値傾向にあった (表3)。一方で HDL-C 値はそれぞれ平均 55±4mg/dl, 42±2mg/dl, 44±3mg/dl であり ε2/3群で ε3/3群に比し高値を認めた (P<0.05)。TG 値は有意ではないが ε3/3群に比し ε3/4群で高値傾向にあった。また、ε3/4群では ε3/3群に比し LDL-C は高値であり、IIb フェノタイプは増加した。

III. ヘテロ FH およびヘテロ FH とヘテロ CETP 欠損の合併例における血清脂質組成

ヘテロ FH とヘテロ CETP 欠損合併16家系20例における血清 CHOL 値は、ヘテロ FH (FH 群) で 364±18mg/dl (\bar{x} ±SEM), ヘテロ FH とヘテロ CETP 欠損の合併 (FH+コレステリルエステル転送蛋白欠損症 (cholestery ester transfer protein deficiency, CETP-D) 群) で 332±15mg/dl, 家系内正常例 (N 群) で 199±3mg/dl であった (表4)。TG 値は各群でそれぞれ 146±28mg/dl, 112±12mg/dl, 91±26mg/dl, LDL-C 値はそれぞれ、288±21mg/dl, 252±16mg/dl, 131±6mg/dl, HDL-C 値はそれぞれ 46±3mg/dl, 60±3mg/dl, 50±6mg/dl であった。FH 群に比し FH+CETP-D 群で、LDL-C の有意ではないが低下傾向を、HDL-C の有意な高値を認めた (P<0.05)。アポ蛋白に関しては各群間で有意差は認められなかった。

家系調査が行いえた1家系においては、発端者 (59才男性) を含め家系内には、ヘテロ FH とヘテロ CETP 欠損 (Int14A) の合併を5例認め、HDL-C は 59-82mg/dl の高値が認められた (図4)。発端者 (59才男性) は手背伸筋腱黄色腫、労作性狭心症を認め、冠動脈造影上、右冠動脈の近位部、遠位部にそれぞれ99, 90%狭窄、左冠動脈の第一対角枝に90%狭窄を認めた。また発端者の弟は44才で心筋梗塞により死亡した。

本家系のヘテロ FH (FH 群) 3例, ヘテロ FH とヘテロ CETP 欠損合併 (FH+CETP-D 群) 4例, ヘテロ CETP 欠損 (CETP-D 群) 1例, 家系内正常 (N 群) 2例の各血清脂質組成を検討した (表5)。FH+CETP-D 群の CHOL, TG, LDL-C, HDL-C 値はそれぞれ、330±17mg/dl (\bar{x} ±SEM), 113±13mg/dl, 246±18mg/dl, 60±4mg/dl であり、LDL-C は FH 群に比し

Table 5. The levels of serum lipids, apolipoproteins, and CETP in the YK family

Group	Number of individuals (M/F)	CHOL (mg/dl)	TG (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	Apo A-I (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo E (mg/dl)	Lp (a) (mg/dl)	HDL ₂ ratio	CETA (% control)	CETP (mg/liter)	Specific activity (% unaffected)
Heterozygous FH	3 (1/2)	342±29	116±53	273±39	46±7	112±6	145±21	6.0±0.8	11.7±3.4	1.0±0.2	115±8	2.5±0.0	92±7
Heterozygous FH+CETP-D (Int14A)	4 (2/2)	283±18	69±17	193±18	76±6	158±12	111±8	4.9±0.8	13.5±5.3	1.3±0.1	71±8	1.8±0.1	73±12
CETP-D (Int14A)	1 (1/0)	207	53	123	73	157	79	3.9	9.3	2.1	59	1.2	97
Unaffected members	2 (1/1)	200±8	58±11	132±16	55±6	133±7	80±7	4.6±0.9	4.1±2.1	1.2±0.3	106±4	2.2±0.2	100±5

All values are Mean±SEM. CETP-D, CETP deficiency; CETA, CETP activity; NS, not significant. * p<0.05, ** p<0.01 by ANOVA. Friedewald formula; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol. * p<0.05, ** p<0.01 by ANOVA.

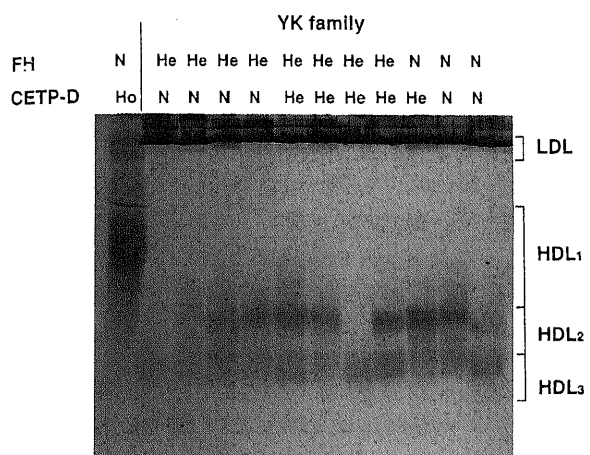


Fig. 5. The lipoprotein profiles of heterozygous FH with or without heterozygous CETP deficiency. Lipoproteins prestained with Sudan black B were separated on a native polyacrylamide gradient gel (4–30%). Ho, homozygotes for an intron 14 splicing defect of the CETP gene; He, heterozygotes for an intron 14 splicing defect of the CETP gene, or heterozygous FH; N, a wild type. Homozygotes for an intron 14 splicing defect showed markedly increased and enlarged HDL, corresponding to HDL₁ subclass (particle size, >12 nm). FH with a heterozygous CETP deficiency showed relatively increased HDL₂ (10–12 nm) to HDL₃ (8–10 nm) ratio as compared to FH without CETP deficiency. Polydispersed but clearly distinct LDL subclasses (LDL₁ and LDL₄) were observed only for the CETP deficient homozygotes.

FH+CETP 群で有意ではないが低下傾向を, HDL-C は FH 群に比し FH+CETP-D 群で高値を認めた. アポ A-I は FH 群に比し FH+CETP-D 群で有意な高値を認めた ($P < 0.05$). CETP 蛋白量, CETP 活性は FH+CETP-D 群で FH 群に比しそれぞれ28%, 40%の低値を認めた ($P < 0.05$, $P < 0.01$). また, CETP 欠損に基づくリポ蛋白像を未変性ポリアクリルアミドゲルで検討した (図5). ヘテロ CETP 欠損例では Int14A のホモ接合体ほど顕著ではなかったが, HDL₂ 分画の相対的な増加を認めた. 一方, FH とヘテロ CETP 欠損の合併例では, HDL₂ 分画の相対的な増加は軽度であった.

IV. ヘテロ FH およびヘテロ FH とヘテロ CETP 欠損の合併例における臨床像の検討

ヘテロ FH とヘテロ CETP 欠損合併22例において, 心筋梗塞2例, 狭心症を5例に, 腹部大動脈瘤を2例に認めた. 年齢, 性別を一致させたヘテロ FH 88例に対して, 有意ではないが心筋梗塞の発生頻度の低値を認めた (表6). しかし, 狭心症, 腹部大動脈瘤の発生頻度に差を認めなかった.

冠動脈造影が施行されているヘテロ FH 男性69例において, CETP 欠損の有無, アポE遺伝型, 血清脂質, アキレス腱黄色腫の有無, 環境因子 (年齢, 肥満, 喫煙), 糖尿病, 高血圧症の有無の CSI に及ぼす影響を検討した. 多変量解析による検討では, 血清 HDL-C は CETP 欠損の有無に最も強い影響をうけ, CETP 欠損が HDL-C 高値を規定する最大因子であった. 喫煙は HDL-C 低値の最大因子であった (表7). アポE遺伝型および他の因子による影響は有意ではなかった. 一方, CSI を規定する因子は, HDL-C は負の因子, 年齢は正の因子であったが,

Table 6. Clinical features of heterozygous FH with or without CETP deficiency

Group	Number of subjects (M/F)	Number (M/F) of subjects with			
		Coronary heart disease			Other atherosclerotic events
		Myocardial infarction	Angina pectoris	No symptoms	Aneurysm of abdominal artery
FH+Heterozygous CETP-D (Int14A)	5 (3/2)		1 (1/0)	4 (2/2)	
FH+Homozygous CETP-D (D442G)	1 (0/1)			1 (0/1)	
FH+Heterozygous CETP-D (D442G)	16 (11/5)	2 (2/0)	4 (2/2)	10 (7/3)	2 (2/0)
All FH+CETP-D	22 (14/8)	2 (2/0)	5 (3/2)	15 (9/6)	2 (2/0)
Heterozygous FH	88 (56/32)	21 (16/5)	18 (12/6)	49 (28/21)	4 (2/2)

M, male; F, female. CETP-D, CETP deficiency.

Table 7. Multiple regression coefficients, F-values, and adjusted R square for serum HDL cholesterol in male heterozygous FH subjects

Step variables	Coefficient	SE	F-value	Adjusted R square	
				Total	Increment
CETP genotype	0.299	0.105	8.06	0.121	0.121
Cigarette smoking	-0.112	0.063	3.17	0.158	0.037

Heterozygous CETP deficiency and normal CETP genotype are assigned a value of 1 and 0, respectively. Cigarette smoking (currently more than 10 cigarettes/day), obesity (more than 10% of ideal body weight), diabetes mellitus, and hypertension are also included as variables. Apo E genotypes consisting in $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ an $\epsilon 4$ alleles are assigned a value of -1, 0, and 1, respectively. HDL cholesterol is transformed to $\ln(x)$ of variables. Intercept for multiple regression is 3.607.

Table 8. Multiple regression coefficients, F-values, and adjusted R square for coronary stenosis index in male heterozygous FH subjects

Step variables	Coefficient	SE	F-value	Adjusted R square	
				Total	Increment
HDL cholesterol	-12.407	4.937	6.32	0.073	0.073
Age	0.172	0.115	2.23	0.091	0.018

Heterozygous CETP deficiency and normal CETP genotype are assigned a value of 1 and 0, respectively. Cigarette smoking (currently more than 10 cigarettes/day), obesity (more than 10% of ideal body weight), diabetes mellitus, and hypertension are also included as variables. Apo E genotypes consisting in $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$ alleles are assigned a value of -1, 0, and 1, respectively. HDL cholesterol and triglyceride are transformed to $\ln(x)$ of variables. Intercept for multiple regression is 50.427.

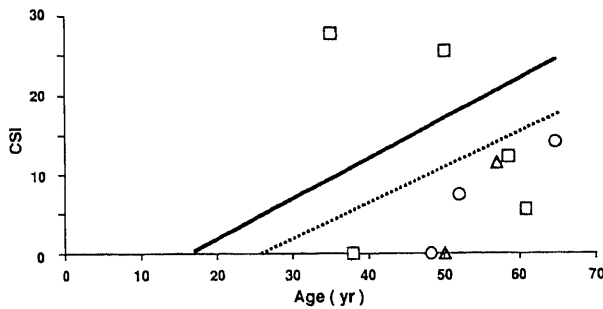


Fig. 6. Scatter-plot of correlation between age and coronary stenosis index in heterozygous FH with heterozygous CETP deficiency. In 105 male and 56 female heterozygous FH patients evaluated by coronary angiography, the regression equations between age (X) and coronary stenosis index (Y) obtained by assigning score (0 to 5) to each 15 coronary artery segments were $Y=0.52X-9.11$ in the male heterozygotes and $Y=0.47X-12.54$ in the female heterozygotes, respectively (see reference 18). The CSI scores in heterozygous FH patients with heterozygous CETP deficiency was largely plotted below the regression lines in heterozygous FH. \square , male heterozygous FH patients with CETP-D (D442G); Δ , male heterozygous FH patients with CETP-D (Int14A); \circ , female heterozygous FH patients with CETP-D (D442G). —, male heterozygous FH patients (n=105); ----, female heterozygous FH patients (n=56).

CETP 欠損の有無, 肥満, 喫煙, 糖尿病, 高血圧の有無, アポ E 遺伝型との有意な相関を認めなかった (表 8). さらに, ヘテロ FH において年齢で推定される CSI の回帰直線上に CETP 欠損合併例をプロットしたところ, 10例中 2例を除き, 推定される CSI 値より低値であった (図 6). 高い CSI を示した 2例のうち 1例は喫煙者であり, また TG の高値を認めた. もう 1例は喫煙者であり, アポ E2 遺伝型であった.

考 察

本研究では冠動脈硬化症と密接な関係のある, 高 LDL-C 血症を特徴とする遺伝性疾患, FH のヘテロ接合体と, 原発性高 HDL-C 血症をもたらす遺伝性疾患, CETP 欠損症のヘテロ接合体との合併例においてリポ蛋白組成ならびに臨床像の検討を行った. ヘテロ FH においてもヘテロ CETP 欠損を合併することで, 高 HDL-C 血症を呈し, 一方 CETP 由来の LDL への CE の供給が減ることで相対的に LDL-C が低下し, リポ蛋白組成は抗動脈硬化的になり好ましいと考えられた. しかし, 狭

心症の発生頻度にヘテロ FH との差を認めず, ヘテロ CETP 欠損による動脈硬化の抑制作用は, 共存する高度の高 LDL-C 血症による動脈硬化の促進作用を凌駕するには弱いと考えられた.

血清 HDL-C と虚血性心疾患との負の相関は多くの疫学調査^{19,20}で明らかであるが, 米国コレステロール教育プログラムの第 2 報²⁷ (adult treatment panel II, ATP-II) では, 血清 HDL-C 値 60mg/dl 以上を虚血性心疾患の負の危険因子と定義した. HDL は動脈硬化の進展に対して抑制的な作用を持つと考えられているがそのメカニズムは不明である. HDL の抗動脈硬化作用として, 血管壁における HDL の直接的な作用や脂質の酸化抑制作用²⁸等があげられるが, 一方, HDL は過剰の CHOL を末梢組織から肝に戻す役割を持っている. これは CHOL 逆転送系¹¹⁻¹⁴とよばれるが, 動脈硬化組織より CHOL を引き抜く作用を促進する点で抗動脈硬化的である. 一方 CETP は HDL から VLDL へ CE を転送する. CE の VLDL および LDL への転送亢進はアポ B 含有リポ蛋白粒子の CE 量を増大させる¹¹⁻¹⁴. アポ B 含有リポ蛋白の肝による処理能が低下している高コレステロール食下, または遺伝性高 VLDL-中間型リポ蛋白 (intermediate density lipoprotein, IDL)-LDL 血症では, CETP の活性化は動脈硬化, すなわち虚血性心疾患の進展を促進するものと考えられる.

一方, FH における LDL-R の遺伝子変異は, 蛋白レベルでは, 蛋白合成の障害 (receptor synthesis defective), 合成された前駆体の細胞内移動の障害 (transport defective), LDL-R への結合の障害 (ligand binding defective), 結合した LDL の取り込みの障害 (internalization defective), レセプターの再利用の障害 (recycling defective) の 5つに大別^{15,39}され, 臨床的な FH の重症度は LDL-R 活性の障害の程度により異なる. また, LDL-R 異常に他の遺伝子異常の合併の存在が示唆され⁴⁰, そのため FH の重症度が軽度となったという報告もある. YK 家系における, LDL-R の遺伝子異常は現在のところ明らかでないが, CETP 欠損の合併により CETP 由来の LDL への CE の供給が減り相対的に LDL-C が低下したことは, FH の重症度は軽度になったものと推定される.

LDL-R は CE 量の豊富な IDL, LDL を取り込み, 血清 CHOL 値を規定する¹⁹. IDL は VLDL 中の TG の LPL による水解産物であるが, アポ E に富むため LDL-R との高親和性を持ち, 血中より速やかに代謝される. FH では LDL-R の異常により IDL の肝への取り込みが遅延し, 一方 LDL への変換が亢進し, より血中 LDL-C 値を上昇させる⁴¹. しかしながら,

FH における著明な LDL 中の CE の増加は肝細胞でのアシル CoA: コレステロールトランスフェラーゼ (acyl-CoA: cholesterol acyltransferase, ACAT) 由来のものであるか, LCAT 由来の HDL から CETP を介したものであるか, あるいは双方の影響を受けたものであるかは不明である. ACAT は CHOL をエステル化する酵素であるが, ヒトでは主に肝, 小腸, 動脈壁で発現し CHOL 代謝および動脈硬化との深い関係を有している. 肝ではリポ蛋白, 特に VLDL および LDL の産生, 分泌に, 小腸では CHOL の吸収に, 動脈壁では CE の沈着に重要な役割を有している⁴². ACAT を阻害したラット, ハムスター, ウサギ, サルでは⁴³ CHOL の小腸からの吸収, 肝での産生が抑制され, VLDL, IDL, LDL が低下しリポ蛋白組成は抗動脈硬化的となる. 一方, CETP のモノクローナル抗体を投与し CETP 活性を阻害した高 CHOL 食負荷ハムスターでは⁴⁴ VLDL, IDL, LDL が低下し, HDL は増加, 大粒子化し, ヒトでのヘテロ接合体性 CETP 欠損例と同様な HDL 組成となる. 我々は以前, FH において CETP 活性が正常の約1.5倍に上昇し, IDL の CE/TG 比が上昇していることを報告した⁴⁵. また, LCAT 活性は FH では亢進しており⁴⁶, LCAT 由来の CETP 経路が FH において IDL, ひいては LDL 中の CE 量のある程度規定していることが想像される. 本研究においても CETP 欠損例で HDL₂/HDL₃比が軽度上昇し HDL 中の CE 量の増加, HDL の大粒子化を認め, さらには相対的な LDL-C の低下を認めた. 以上の点から, CETP 由来の CE の供給が FH の動脈硬化性に影響を与え, CETP の阻害はアポ B 含有リポ蛋白の CE の低下をもたらす, リポ蛋白組成は抗動脈硬化的として好ましいものになると思われる. さらには ACAT ならびに CETP 阻害剤の高 LDL-C 血症例での臨床での有用性も期待される.

また, アポ E もリポ蛋白代謝, 動脈硬化性に影響を与える. アポ E の接合子頻度には人種差⁴⁷⁻⁵⁰が認められ, 日本人では ε4 接合子の出現頻度が低く, 逆に欧米人では ε4 接合子の出現頻度が高く冠動脈硬化症との関連が報告されている⁵¹⁻⁵³. アポ E は LDL-R, LDL-R 関係蛋白 (LDL-R related protein) のリガンドとして特に TG に富むリポ蛋白の代謝に重要な役割を果たしている⁵⁴. ε2 接合子は LDL-R への結合が野生型である ε3 の 1% 以下であり, ε4 は LDL-R への結合は正常であるが一方で VLDL, キロミクロンへの親和性が高く^{55,56}, これらリポ蛋白の肝への取り込みの亢進が LDL-R の発現を抑制し, 結果として LDL-C が上昇し動脈硬化的なりポ蛋白組成となる. 逆に ε2 は通常では LDL-C はむしろ低値であり, 遺伝的素因, 環境因子がひきがねとなり, ε2 の LDL-R への親和性の著明な低下により, VLDL 遺残物の代謝が円滑に行われずⅢ型高脂血症を発生する. FH においても一般人における報告と同様にアポ E 遺伝型がリポ蛋白組成に影響を与えると言われる^{57,58}. 本研究においてもヘテロ FH 男性 ε4 接合子例では LDL-C, TG 値の高値を認め, 動脈硬化促進的なりポ蛋白組成となった. しかしながら, ε2 接合子例では一般人で認められている LDL-C の低下を認めず, むしろ高値であった. ヘテロ FH で一つでも ε2 接合子をもち TG150mg/dl 以上で VLDL/TG 比が0.3以上に上昇した, いわゆる β-VLDL が蓄積したⅢ型脂質代謝異常⁵⁹では, FH のモデル動物である WHHL ウサギと同様なリポ蛋白組成となり⁶⁰, 冠動脈硬化のリスクを高めることが想像されている. また, アポ E 欠損マウス⁶¹は低脂肪, 低 CHOL 食でも容易に強

度の動脈硬化を大動脈根部を含む全体に引き起こすことは, マウスでは, VLDL 遺残物の代謝が動脈硬化との密接な関係にあることが想像される. FH は, とくにホモ接合体で VLDL 遺残物の代謝の遅延が認められ, LDL-R 異常とそれによる VLDL 遺残物の代謝障害の合併は動脈硬化のリスクを増強させるものと考えられる. しかしながら, 今回ヘテロ FH における多変量解析での冠動脈硬化に及ぼす影響は, 喫煙, 肥満など環境因子による影響と同様にアポ E 遺伝型による影響は有意ではなかった. アポ E 遺伝型のリポ蛋白組成及び動脈硬化性に及ぼす影響は性別, 環境因子, 他の遺伝性素因の関与も考慮する必要があるものと思われる.

一方, FH において Lp (a) の高値が認められているが⁶², Lp (a) が冠動脈硬化性心疾患に対する強力な危険因子であるかどうかは議論がわかれている⁶³⁻⁶⁴. また, 血清 Lp (a) 値とアポ E 遺伝型との関連も特異的ではない⁶⁵. Lp (a) が LDL-R で代謝されるかどうかは不明であり^{66,67}, それは, LDL-R 活性を上昇させる抗脂質剤でも血清 Lp (a) 値に影響を与えない⁶⁸ことから想像される. 一方で CETP 欠損例で Lp (a) の低下傾向も認めているが⁶⁹, FH と CETP 欠損が合併した YK 家系において, FH 群と FH+CETP 欠損群で Lp (a) の差を認めなかった. Lp (a) の脂質代謝面での動脈硬化性に対してはさらなる検討が必要と思われる.

FH において血清 HDL-C は低値である^{70,71}が, これはホモ接合体でより顕著である. ホモ接合体性 FH 患者⁷², WHHL ウサギ⁷³での動力学による研究では, アポ A-I の代謝亢進と産生低下が HDL-C の低下と関連するという. HDL は HDL₂分画が低下し, 反対にアポ E に富む HDL 粒子が増加する. アポ E に富む HDL は速やかに VLDL 遺残物レセプターなどで代謝されると考えられる. また, CETP 経路の活性化もアポ A-I の代謝亢進に寄与するものと考えられる. 事実, イントロン14のホモ接合体性 CETP 欠損では, HDL₂分画と同時にアポ E に富む HDL が増加しており⁷⁴, HDL の代謝遅延が示唆される. よって, CETP 経路がアポ A-I, アポ E を介した CE の代謝に重要な役割をもつものと考えられる.

また, 遺伝子異常, 遺伝的素因のほか, 環境因子も HDL の代謝ひいては動脈硬化性に影響を及ぼす. 本研究でヘテロ FH 男性における, 年齢, 肥満, 喫煙, CETP 欠損の有無, アポ E 遺伝型, 糖尿病, 高血圧の有無の多変量解析による血清 HDL-C におよぼす影響は, CETP 欠損が血清 HDL-C を上昇させる最大因子であり, 喫煙が血清 HDL-C を低下させる最大因子であった. 喫煙者で血清 HDL-C (特に HDL₂) が低下するという報告があるが, 喫煙の HDL-C に及ぼす影響は様々の因子で修飾されていると思われる. 喫煙者では TG 値と HDL-C 値との相関が認められ, さらに LPL 活性の低下が認められている⁶⁷. 一方 CETP 活性に及ぼす影響は増加, 軽度低下と一致していない⁷⁵. また, 喫煙は虚血性心疾患の危険因子であるが, その動脈硬化性は LDL の酸化作用⁷⁶とともに HDL 代謝への影響が関与している. ヘテロ FH 男性における年齢, 肥満, 喫煙, CETP 欠損の有無, アポ E 遺伝型, 糖尿病, 高血圧の有無, 血清 LDL-C, HDL-C, TG の多変量解析による CSI に及ぼす影響は HDL-C と負の関係, 年齢と正の関係があり, 環境因子, アポ E 遺伝型, 糖尿病, 高血圧の影響は小さかった. また CSI に及ぼす影響で, HDL-C では負の関係が得られたのに対し, CETP 欠損の有意な影響はみられなかったが, CETP 欠損

の HDL-C 高値に対する寄与率が 9% と推定されており¹³⁾、他の因子の HDL-C に対する影響により有意差が認められなかったものと考えられる。また、ヘテロ FH とヘテロ CETP 欠損合併 10 例中 2 例を除き、推定される CSI 値は低値であった。2 例とも喫煙者であり、また 1 例は TG の高値を認めた。また別の 1 例はアポ E の ε2 遺伝型であった。よって、ヘテロ CETP 欠損では共存する原発性高 LDL-C 血症による動脈硬化の促進作用を凌駕するには HDL-C の動脈硬化抑制作用は十分でなく、HDL 代謝へ影響を与える動脈硬化の危険因子によりさらに動脈硬化は進行したものと思われる。本研究で YK 家系において、ヘテロ接合体性 CETP 欠損の合併で CETP は約 30% 低下し、HDL-C の上昇はわずかにあった。さらに、ホモ接合体性 CETP 欠損例でみられるのと同様に HDL-C が上昇し、CETP が低下した場合に高 LDL-C 血症による動脈硬化の促進作用を抑制しえるかどうか興味もたれる。

近年、リポ蛋白代謝ならびに動脈硬化性に関して、様々なリポ蛋白転送にかかわる遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスによる研究が確立され¹⁷⁾、これら遺伝子の機能、ならびにヒトにおける様々な脂質代謝異常の原因が明確となってきている。アポ E 欠損マウス⁶¹⁾⁷⁶⁾は低脂肪、低 CHOL 食でも容易に強度の動脈硬化を大動脈根部を含む全体に引き起こし、その動脈硬化病変の分布は動脈硬化食負荷 WHHL ウサギ、サルなどと同様であり、ヒトにおける動脈硬化の病因を考えるうえで適切なモデルである。そのアポ E 欠損マウスでの動脈硬化は、アポ蛋白 A-I の発現量、HDL-C の増加とともに動脈硬化が抑制される⁷⁹⁾⁸⁰⁾。一方、ヒトでのホモ FH のモデルとしての、LDL-R 欠損マウス⁸¹⁾⁸²⁾は高脂肪、CHOL 負荷にて、黄色腫を伴う動脈硬化が大動脈根部、冠動脈口などに認められるが、アポ E 欠損マウスほど強度ではない。LDL-R 欠損マウスにアポ蛋白 A-I を発現させたトランスジェニックマウスでの動脈硬化性の研究はまだなされていないが、FH で HDL が十分に高値の際の抗動脈硬化性の研究に寄与するものと考えられる。さらには、アポ E 欠損マウスと同様に VLDL 遺残物の代謝が遅延している FH においても、ホモ接合体性 CETP 欠損、あるいはそのレベルまでの CETP 阻害剤などによる著明な HDL-C の増加が動脈硬化の進展を抑制できる可能性を示唆した。

結 論

ヘテロ接合体性 FH 患者を対象に、ヘテロ接合体性 CETP 欠損合併例の血清リポ蛋白組成の特徴と臨床像を検討し以下の結果を得た。

1. ヘテロ FH におけるヘテロ CETP 欠損例の変異接合子頻度は一般人の推定頻度と同頻度に認められた。
2. ヘテロ FH とヘテロ CETP 欠損の合併例 (FH+CETP-D 群) のリポ蛋白組成はヘテロ FH 例 (FH 群) に比し CETP の低下により LDL-C の低下傾向を、HDL-C の有意な高値を認め、相対的に抗動脈硬化的と考えられた。
3. ヘテロ FH とヘテロ CETP 欠損の合併例 (FH+CETP-D 群) の臨床像は有意ではないがヘテロ FH 例 (FH 群) に比し心筋梗塞の発生頻度の低値を認めた。しかしながら、狭心症の発生頻度に差を認めなかった。ヘテロ FH 男性による多変量解析による検討では、CSI は HDL-C と負の、年齢と正の相関を認めたが、肥満、喫煙、糖尿病、高血圧の有無、アポ E 遺伝型との有意な相関を認めなかった。また、ヘテロ CETP 欠損合

併例では、10 例中 2 例を除き年齢で推定される CSI 値は低値であった。

4. 以上より、高 LDL-C 血症例において、CETP 低下に基づく高 HDL-C 血症は望ましいが、冠動脈硬化性心疾患の発症を抑制できるほど十分ではなかったと考えられる。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師馬淵 宏教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を直接御指導、御教示頂きました金沢大学医学部内科学第二講座の稲津明広博士ならびに小泉順二講師に心から謝意を表します。また多大なる御協力を頂きました金沢大学医学部内科学第二講座第一研究室の各位、ならびに高分子 DNA の採取に際し御協力を頂いた山本幸夫氏、見砂知子氏に感謝いたします。また、貴重な症例を御紹介頂いた上田幸生先生 (小松市民病院内科)、竹越忠美先生 (福井県立病院内科)、島田敏實先生 (福井県立病院内科)、伊藤英章先生 (輪島病院内科) に感謝いたします。

本研究の一部は、Asian-Pacific Congress on Lipid Risk Factor Control (平成 6 年 1 月 24-28 日) において発表した。

文 献

- 1) Tall, A. R.: Plasma high density lipoproteins: Metabolism and relationship to atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 86, 379-384 (1990).
- 2) Johnson, W. J., Mahlberg, F. H., Rothblat, G. H. & Phillips, M. C.: Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1085, 273-298 (1991).
- 3) 稲津明広, 馬淵 宏: HDL コレステロール. *臨床医*, 638, 221-224 (1993).
- 4) Tall, A. R.: Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J. Lipid. Res.*, 34, 1255-1274 (1993).
- 5) Weitzman, J. B. & Vladutiu A. O.: Very high values of serum high-density lipoprotein cholesterol. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 116, 831-836 (1992).
- 6) Haffner, S. M., Bowden, D. A., Wahl, P. W., Hoover, J. J., Warnick, G. R., Albers, J. J. & Hazzard W. R.: Epidemiological correlates of high density lipoprotein subfractions, apolipoproteins A-I, A-II, and D, and lecithin cholesterol acyltransferase: effects of smoking, alcohol, and adiposity. *Arteriosclerosis*, 5, 169-177 (1985).
- 7) Freeman, D. J., Griffin, B. A., Murray, E., Lindsay, G. M., Gaffney, D., Packard, C. J. & Shepherd, J.: Smoking and plasma lipoproteins in man: effects on low density lipoprotein cholesterol levels and high density lipoprotein subfraction distribution. *Eur. J. Clin. Invest.*, 23, 630-640 (1993).
- 8) Williams, P. T., Vranizan, K. M., Austin, M. A. & Krauss, R. M.: Associations of age, adiposity, alcohol intake, menstrual status, and estrogen therapy with high-density lipoprotein subclasses. *Arterioscler Thromb.*, 13, 1654-1661 (1993).
- 9) Williams, P. T., Stefanick, M. L., Vranizan, K. M., & Wood P. D.: The effects of weight loss by exercise or by dieting on plasma high-density lipoprotein (HDL) levels in men with low, intermediate, and normal-to-high HDL at baseline. *Metabolism*, 43, 917-924 (1994).

- 10) Breslow, J. L.: Genetic basis of lipoprotein disorders. *J. Clin. Invest.*, **84**, 373-380 (1989).
- 11) Inazu, A., Brown, M. L., Hesler, C. B., Agellon, L. B., Koizumi, J., Takata, K., Maruhama, Y., Mabuchi, H. & Tall, A. R.: Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N. Engl. J. Med.*, **323**, 1234-1238 (1990).
- 12) Inazu, A., Koizumi, J., Haraki, T., Yagi, K., Wakasugi, T., Takegoshi, T., Mabuchi, H. & Takeda, R.: Rapid detection and prevalence of cholesteryl ester transfer deficiency caused by an intron 14 splicing defect in hyperalphalipoproteinemia. *Hum. Genet.*, **91**, 13-16 (1993).
- 13) Inazu, A., Jiang, X. C., Haraki, T., Yagi, K., Kamon, N., Koizumi, J., Mabuchi, H., Takeda, R., Takata, K., Moriyama, Y., Doi, M. & Tall, A. R.: Genetic cholesteryl ester transfer deficiency caused by two prevalent mutations as a major determinant of increased level of high density lipoprotein cholesterol. *J. Clin. Invest.*, **94**, 1872-1882 (1994).
- 14) Koizumi, J., Inazu, A., Yagi, K., Koizumi, I., Uno, Y., Kajinami, K., Miyamoto, S., Moulin, P., Tall, A. R., Mabuchi, H. & Takeda, R.: Serum lipoprotein lipid concentration and composition in homozygous and heterozygous patients with cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Atherosclerosis*, **90**, 189-196 (1991).
- 15) Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Familial hypercholesterolemia. *In* C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle, J. B. Stanburg, J. B. Wyngaarden & D. S. Fredrickson (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th ed., P. 1215-1250, McGraw-Hill Information Services Co., New York, 1989.
- 16) 馬淵 宏: 家族性高コレステロール血症, 第1版, 9-43頁, 南江堂, 東京, 1991.
- 17) Mabuchi, H., Tatami, R., Haba, T., Ueda, R., Haba, T., Kametani, T., Watanabe, A., Wakasugi, T., Itoh, S., Koizumi, J., Ohta, M., Miyamoto, S. & Takeda, R.: Serum lipid and lipoprotein levels in Japanese patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **32**, 435-444 (1979).
- 18) Mabuchi, H., Koizumi, J., Shimizu, M., Takeda, R. & The Hokuriku FH-CHD study group: Development of coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *Circulation*, **79**, 225-232 (1989).
- 19) Kitamura, A., Iso, H., Naito, Y., Iida, M., Konishi, M., Folsom, A. R., Sato, S., Kiyama, M., Nakamura, M., Sankai, T., Shimamoto, T. & Komachi, Y.: High-density lipoprotein cholesterol and premature coronary heart disease in urban Japanese men. *Circulation*, **89**, 2533-2539 (1994).
- 20) Gordon, D. J. & Rifkind, B. M.: High-density lipoprotein: The clinical implications of recent studies. *N. Eng. J. Med.*, **321**, 1311-1316 (1989).
- 21) 馬淵 宏, 多々見良三, 上田幸生, 上田良成, 羽場利博, 亀谷富夫, 伊藤清吾, 小泉順二, 宮元 進, 太田正之, 竹田亮祐, 竹越忠美: 日本人の家族性高コレステロール血症の診断基準について. *日老医誌*, **14**, 475-479 (1977).
- 22) Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, S. G., Richmond, C. W. & Fu, P. C.: Enzymatic determination of serum total cholesterol. *Clin. Chem.*, **20**, 470-475 (1974).
- 23) Bucolo, G. & David, H.: Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin. Chem.*, **19**, 476-482 (1973).
- 24) Burstein, M. & Scholnich, H. R.: Lipoprotein-polyanion-metal interactions. *Adv. Lipid. Res.*, **11**, 67-108 (1973).
- 25) Friedewald, W. I., Levy, R. I. & Fredrickson, D. S.: Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.*, **18**, 499-502 (1972).
- 26) Kajinami, K., Mabuchi, H., Koizumi, J. & Takeda, R.: Serum apolipoproteins in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Clin. Chim. Acta*, **211**, 93-99 (1992).
- 27) Koizumi, J., Koizumi, I., Uno, Y., Inazu, A., Kajinami, K., Haraki, T., Yagi, K., Kamon, N., Miyamoto, S., Takegoshi, T., Mabuchi, H., Takeda, R., Tani, N. & Takada, S.: Reduction of lipoprotein (a) by LDL-apheresis using a dextran sulfate cellulose column in patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **100**, 65-74 (1993).
- 28) Cheng, M. L., Kammerer, C. M., Lowe, W. F., Dyke, B. & VandeBerg, J. L.: Method for quantitating cholesterol in subfractions of serum lipoproteins separated by gradient gel electrophoresis. *Biochem. Genet.*, **26**, 657-681 (1988).
- 29) Vandenplas, S., Wild, I., Rabie, A. G., 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).
- 30) Davignon, J., Gregg, R. E. & Sing, C. F.: Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*, **8**, 1-21 (1988).
- 31) Walden, C. C. & Hegele, R. A.: Apolipoprotein E in hyperlipidemia. *Ann. Intern. Med.*, **120**, 1026-1036 (1994).
- 32) Mahley, R. W.: Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, **240**, 622-630 (1988).
- 33) Hixon, J. E. & Vernier, D. T.: Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J. Lipid. Res.*, **31**, 545-548 (1990).
- 34) Marcel, Y. L., McPherson, R., Houge, M., Czarnecka, H., Zawadzki, Z., Weech, P. K., Whitlock, M. E., Tall, A. R. & Milne, R. W.: Distribution and concentration of cholesteryl ester transfer protein in plasma of normolipidemic subjects. *J. Clin. Invest.*, **85**, 357-363 (1990).
- 35) Koizumi, J., Mabuchi, H., Yoshimura, A., Michishita, I., Takeda, M., Itoh, H., Sakai, Y., Sakai, T., Ueda, K. & Takeda, R.: Deficiency of serum cholesteryl-ester transfer activity in patients with familial hyperalphalipoproteinaemia. *Atherosclerosis*, **58**, 175-186 (1985).

- 36) Wang, S., Deng, L., Brown, M. L., Agellon, L. B. & Tall, A. R.: Structure-function studies of human cholesteryl ester transfer protein by linker insertion scanning mutagenesis. *Biochemistry*, **30**, 3484-3490 (1991).
- 37) Summary of the second report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel II). *JAMA*, **269**, 3015-3023 (1993).
- 38) Bowry, V. W., Stanley, K. K. & Stocker, R.: High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 10316-10320 (1992).
- 39) Goldstein, J. L. & Brown, M. S.: The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 897-930 (1977).
- 40) Hobbs, H. H., Leitersdorf, E., Leffert, C. C., Cryer, D. R., Brown, M. S. & Goldstein, J. L.: Evidence for a dominant gene that suppresses hypercholesterolemia in a family with defective low density lipoprotein receptors. *J. Clin. Invest.*, **84**, 656-664 (1989).
- 41) Fisher, W. R., Zech, L. A. & Stacpoole, P. W.: Apo B metabolism in familial hypercholesterolemia: Inconsistencies with the LDL receptor paradigm. *Arterioscler. Thromb.*, **14**, 501-510 (1994).
- 42) Suckling, K. E. & Stange, E. F.: Role of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in cellular cholesterol metabolism. *J. Lipid. Res.*, **26**, 647-671 (1985).
- 43) Marzetta, C. A., Savoy, Y. E., Freeman, A. M., Long, C. A., Pettini, J. L., Hagar, R. E., Inskeep, P. B., Davis, K., Stucchi, A. F., Nicolosi, R. J. & Hamanaka, E. S.: Pharmacological properties of novel ACAT inhibitor (CP-113, 818) in cholesterol-fed rats, hamsters, rabbits, and monkeys. *J. Lipid. Res.*, **35**, 1829-1838 (1994).
- 44) Evans, G. F., Bensch, W. R., Apelgren, L. D., Bailey, D., Kauffman, R. F., Bumol, T. F. & Zuckerman, S. H.: Inhibition of cholesteryl ester transfer protein in normocholesterolemic and hypercholesterolemic hamsters: effects on HDL subspecies, quantity, and apolipoprotein distribution. *J. Lipid. Res.*, **35**, 1634-1645 (1994).
- 45) Inazu, A., Koizumi, J., Mabuchi, H., Kajinami, K. & Takeda, R.: Enhanced cholesteryl ester transfer protein activities and abnormalities of high density lipoproteins in familial hypercholesterolemia. *Horm. Metab. Res.*, **24**, 284-288 (1992).
- 46) Roberts, D. C. K., Round, J. M., Lloyd, J. K. & Fosbrooke, A. S.: Serum lecithin-cholesterol acyltransferase activity in children with familial hyperbeta lipoproteinaemia. *Clin. Chim. Acta.*, **78**, 311-314 (1977).
- 47) Ordovas, J. M., Litwack-Klein, L., Wilson, P. W. F., Schaefer, M. M. & Schaefer, E. J.: Apolipoprotein E isoform phenotyping methodology and population frequency with identification of apo E1 and apo E5 isoforms. *J. Lipid. Res.*, **28**, 371-380 (1988).
- 48) Ehnholm, C., Lukka, M., Kuusi, T., Nikkila, E. & Utermann G.: Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population: gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations. *J. Lipid. Res.*, **27**, 227-235 (1986).
- 49) Eto, M., Watanabe, K. & Ishii, K.: Reciprocal effects of apolipoprotein E alleles ($\epsilon 2$ and $\epsilon 4$) on plasma lipid levels in normolipidemic subjects. *Clin. Genet.*, **29**, 477-484 (1986).
- 50) Wang, K.: Studies of human apolipoprotein E genetic isoforms and their phenotypes among the Chinese population. *Acta. Acad. Med. Sinicae.*, **8**, 198 (1986).
- 51) Kuusi, T., Nieminen, M. S., Ehnholm, C., Y-Jarvinen, H., Valle, M., Nikkila, E. A. & Taskinen, M. R.: Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease: Increased prevalence of apolipoprotein E-4 in angiographically verified coronary patients. *Arteriosclerosis*, **9**, 237-241 (1989).
- 52) Hixon, J. E. & The PDAY group.: Apolipoprotein E polymorphism affect atherosclerosis in young males. *Arterioscler. Thromb.*, **11**, 1237-1244 (1991).
- 53) Katzel, L. I., Fleg, J. L., Paidi, M., Ragoobarsingh, N. & Goldberg, A. P.: Apo E4 polymorphism increases the risk for exercise-induced silent myocardial ischemia in older men. *Arterioscler. Thromb.*, **13**, 1495-1500 (1993).
- 54) Wilson, C., Wardell, M. R., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W. & Agard, D. A.: Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science*, **252**, 1817-1822 (1991).
- 55) Weisgraber, K. H., Innerarity, T. L. & Mahley, R. W.: Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J. Biol. Chem.*, **257**, 2518-2521 (1982).
- 56) Gregg, R. E., Zech, L. A., Schaefer, E. J., Stark, D., Wilson, D. & Brewer, H. B. Jr.: Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans. *J. Clin. Invest.*, **78**, 815-821 (1986).
- 57) Ferrieres, J., Sing, C. F., Roy, M., Davignon, J. & L-Cacan, S.: Apolipoprotein E polymorphism and heterozygous familial hypercholesterolemia: Sex-specific effects. *Arterioscler. Thromb.*, **14**, 1553-1560 (1994).
- 58) Eto, M., Watanabe, K., Chonan, N. & Ishii, K.: Familial hypercholesterolemia and apolipoprotein E4. *Atherosclerosis*, **72**, 123-128 (1988).
- 59) Hopkins, P. N., Wu, L. L., Schumacher, M. C., Emi, M., Hegele, R. M., Hunt, S. C., Lalouel, J. M. & Williams, R. R.: Type III dyslipoproteinemia in patients heterozygous for familial hypercholesterolemia and apolipoprotein E2: Evidence for a gene-gene interaction. *Arterioscler. Thromb.*, **11**, 1137-1146 (1991).
- 60) Watanabe, Y., Ito, T. & Shiomi, M.: The effect of selective breeding on the development of coronary atherosclerosis in WHHL rabbits. *Atherosclerosis*, **56**, 71-79 (1985).
- 61) Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., A-Setala, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G., Rubin, E. M. & Breslow, J. L.: Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous

- recombination in ES cells. *Cell*, **71**, 343-353 (1992).
- 62) Utermann, G., Hoppichler, F., Dieplinger, H., Seed, M., Thompson, G. & Boerwinkle, E.: Defects in the low density lipoprotein receptor gene affect lipoprotein (a) levels: Multiplicative interaction of two gene loci associated with premature atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**, 4171-4174 (1989).
- 63) Wiklund, O., Angelin, B., Olofsson, S. O., Eriksson, M., Fager, G., Berglund, L. & Bondjers, G.: Apolipoprotein (a) and ischemic heart disease in familial hypercholesterolaemia. *Lancet*, **335**, 1360-1363 (1990).
- 64) Mbewu, A. D., Bhatnager, D., Durrington, P. N., Hunt, L. Ishola, M., Arrol, S., Mackness, M., Lockley, P. & Miller, J. P.: Plasma lipoprotein (a) in patients heterozygous for familial hypercholesterolemia, their relatives, and unrelated control populations. *Arterioscler. Thromb.*, **11**, 940-946 (1991).
- 65) Berglund, I., Wiklund, O., Eggertsen, G., Olofsson, S. O., Eriksson, M., Linden, T., Bondjers, G. & Angelin, B. Apolipoprotein E phenotypes in familial hypercholesterolemia: importance for expression of disease and response to therapy. *J. Intern. Med.*, **233**, 173-178 (1993).
- 66) Knight, B. L., Perombelon, Y. F. N., Soutar, A. K., Wade, D. P. & Seed, M.: Catabolism of lipoprotein (a) in familial hypercholesterolaemic subjects. *Atherosclerosis*, **87**, 227-237 (1991).
- 67) Ghiselli, G., Gaddi, A., Barozzi, G., Ciarrocchi, A. & Descovich, G.: Plasma lipoprotein (a) concentration in familial hypercholesterolemia patients without coronary artery disease. *Metabolism*, **41**, 833-838 (1992).
- 68) Kostner, G. M., Gavish, D., Leopold, B., Bolzano, K., Weintraub, M. S., & Breslow, J. L.: HMG CoA reductase inhibitors lower LDL cholesterol without reducing Lp (a) levels. *Circulation*, **80**, 1313-1319 (1989).
- 69) 稲津明広, 小泉順二, 原城達夫, 北谷真子, 東方利徳, 八木邦公, 馬淵 宏, 竹田亮祐: CETP 欠損症における血清 Lp (a) の検討. *動脈硬化*, **21**, 234 (1993).
- 70) Goldberg, R. B., Fless, G. M., Baker, S. G., Joffe, B. I., Getz, G. S., Scanu, A. M. & Seftel, H. C.: Abnormalities of high density lipoproteins in homozygous familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis*, **4**, 472-478 (1984).
- 71) Keidar, S., Ostlund, R. E. & Schonfeld, G.: Apolipoprotein E-rich HDL in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **84**, 155-163 (1990).
- 72) Schaefer, J. R., Rader, D. J., Ikewaki, K., Fairwell, T., Zech, L. A., Kindt, M. R., Davignon, K. J., Gregg, R. E. & Brewer, H. B. Jr.: In vivo metabolism of apolipoprotein A-I in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb.*, **12**, 843-848 (1992).
- 73) Saku, K., Yamamoto, K., Sakai, T., Yanagida, T., Hidaka, K., Sakai, J. & Arakawa, K.: Kinetics of HDL-apo-A-I in the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **79**, 225-230 (1989).
- 74) Yamashita, S., Sprecher, D. L., Sakai, N., Matsuzawa, Y., Tarui, S. & Hui, D. Y.: Accumulation of apolipoprotein E-rich high density lipoproteins in hyperalphalipoproteinemic human subjects with plasma cholesteryl ester transfer deficiency. *J. Clin. Invest.*, **86**, 688-695 (1990).
- 75) Dullaart, R. P. F., Hoogenberg, K., Dikkeschei, B. D. & van Tol, A.: Higher plasma lipid transfer protein activities and unfavorable lipoprotein changes in cigarette-smoking men. *Arterioscler. Thromb.*, **14**, 1581-1585 (1994).
- 76) Scheffler, E., Weist, E., Woehrle, J., Otto, I., Shultz, I., Huber, L., Ziegler, R. & Dresel, H. A.: Smoking influences the atherogenic potential of low-density lipoprotein. *Clin. Investig.*, **70**, 263-268 (1992).
- 77) Breslow, J. L.: Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, 8314-8318 (1993).
- 78) Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L. & Ross, R.: Apo-E deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler. thromb.*, **14**, 133-140 (1994).
- 79) Paszty, C., Maeda, N., Verstuyft, J. & Rubin, E. M.: Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice. *J. Clin. Invest.*, **94**, 899-903 (1994).
- 80) Plump, A. S., Scott, C. J. & Breslow, J. L.: Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**, 9607-9611 (1994).
- 81) Ishibashi, S., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Gerard, R. D., Hammer, R. E. & Herz, J.: Hypercholesterolemia in the low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.*, **92**, 883-893 (1993).
- 82) Ishibashi, S., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Herz, J. & Burns, D. K.: Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J. Clin. Invest.*, **93**, 1885-1893 (1994).

Clinical Characteristics of Double Heterozygotes with Familial Hypercholesterolemia and Cholesteryl Ester Transfer Protein Deficiency Tatsuo Haraki, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., **104**, 230—244 (1995)

Key words familial hypercholesterolemia, cholesteryl ester transfer protein deficiency, double heterozygote, high density lipoprotein cholesterol, coronary heart disease

Abstract

Low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) is an independent risk factor for atherosclerotic coronary heart disease (CHD). Conversely, an increased high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) level (≥ 60 mg/dl) is a negative risk factor for CHD. Plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency (CETP-D) is a defined genetic cause of hyper-HDL-cholesterolemia. On the other hand, familial hypercholesterolemia (FH) is a disorder caused by mutations in the LDL receptor (LDL-R) gene, and is associated with premature CHD. In 288 unrelated subjects with heterozygous FH, allele frequency of the splicing defect of intron 14 (Int14A) and missense mutation in exon 15 (D442G) of the CETP gene were 0.3% and 3.0%, respectively. Among 12 FH patients without CETP-D, 20 FH patients with CETP-D, and 5 unaffected members from 16 families with heterozygous FH, serum HDL-C levels were 46 ± 3 mg/dl (Mean \pm SEM), 60 ± 3 and 50 ± 6 , LDL-C levels were 288 ± 21 mg/dl, 252 ± 16 and 131 ± 6 , respectively. HDL-C levels in FH patients with CETP-D were higher than those without CETP-D ($P < 0.05$), and LDL-C levels in FH patients with CETP-D were marginally lower. These results indicate that the lipoprotein profiles in FH with CETP-D are relatively anti-atherogenic as compared with those in FH without CETP-D. However, myocardial infarction occurred in two FH patients with CETP-D, and five FH patients with CETP-D suffered from effort angina pectoris and/or coronary artery disease. Thus, the anti-atherogenicity of hyper-HDL-cholesterolemia caused by a partial deficiency of CETP is insufficient to prevent coronary heart disease in concurrent severe hyper-LDL-cholesterolemia in FH.