

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月21日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590616

研究課題名（和文）アンジオポエチン様蛋白異常による高比重リポ蛋白血症の抗動脈硬化性

研究課題名（英文）Anti-atherogenicity of increased levels of HDL caused by angiopoietin-like protein gene mutations

研究代表者

稲津 明広（INAZU AKIHIRO）

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：80293348

研究成果の概要（和文）：高比重リポ蛋白（HDL）コレステロールが高い人は（100 mg/dL 以上）は本邦の一般人の約 1%に見られ、その半数でコレステリルエステル転送蛋白欠損が関与しているが、その他の成因の大部分は不明である。アンジオポエチン様蛋白は内因性のリパーゼインヒビターであり、リパーゼ活性を調節することにより HDL 粒子の異化に関与する。アンジオポエチン様蛋白 4 はリポ蛋白リパーゼのインヒビターとして作用し、アンジオポエチン様蛋白 3 は血管内皮リパーゼのインヒビターとして作用する。本研究で CETP 欠損が除外された高 HDL 血症 45 例の末梢血液由来のゲノム遺伝子を用いて、両遺伝子の遺伝子変異の検索を行ったが、変異は同定できなかった。

研究成果の概要（英文）：Increased levels of plasma HDL is frequently found in ~1% of general Japanese population. Genetic cause of high HDL levels has been uncertain except CETP deficiency. Plasma angiopoietin-like protein 3 and 4 are known as an intrinsic lipase inhibitor against lipoprotein lipase and endothelial lipase, respectively. Although every exon in these two genes was screened in subjects with increased HDL levels but without CETP deficiency, mutation was not found.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総 計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：臨床化学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：リポ蛋白，リパーゼ，高 HDL 血症，アンジオポエチン様蛋白，遺伝子変異

## 1. 研究開始当初の背景

高 HDL 血症の分類は本邦で初めて WHO 分類に追加されたものである。リポ蛋白間の非極性脂質であるコレステリルエステル (CE)，ト

リグリセリドを転送するコレステリルエステル転送蛋白 (CETP) 蛋白が欠損すると HDL 脂質の異化が低下し、高 HDL 血症となる。他の

成因による高 HDL 血症は必ずしも抗動脈硬化的でない可能性があり、この点を明らかにすることは循環器病疫学において重要な課題である。冠動脈疾患など動脈硬化症の危険因子として LDL コレステロール高値はよく確立され、スタチンによる LDL 低下療法が心血管イベントを減少させる。一方、申請者らは LDL コレステロールが遺伝的に高い冠動脈硬化のモデル疾患である家族性高コレステロール血症においても男性、高血圧症、糖尿病以外にエストロゲンレセプター多型 (Lu, Inazu et al. ATVB 2002), CETP のプロモーター多型が有意に冠リスクに影響することを明らかにした (Takata, Inazu et al. Clin Sci 2006)。よって、他のリスクファクターに介入することで、さらに心血管イベント抑制が可能になると考えている (Inazu and Mabuchi, Curr Opin Investig Drugs 2003; Mabuchi and Inazu, Future lipidology 2006)。申請者は遺伝性高 HDL 血症の成因に関して研究しており、本邦の高 HDL 血症 (HDL-cholesterol > 100 mg/dL) が比較的高頻度であり (男性 0.8%, 女性 0.5%), さらに血漿 CETP の遺伝的に低下した CETP 欠損症が高 HDL 血症の主因であることを報告してきた (Inazu et al. NEJM, 1990; Inazu et al. J Clin Invest, 1994)。しかしながら、CETP 遺伝子の変異・多型の検索のみでは高 HDL 血症の約 50%程度しか説明できず、その他の成因については不詳である。申請者はこれまで多数の高 HDL 血症例を経験し、ホモ接合体性 CETP 欠損 50 例、ヘテロ接合体 200 例以上を診断した。CETP 欠損を伴わない高 HDL 血症の特徴は低 TG 血症であり、LPL 活性亢進に関連した遺伝子異常が想定された。その具体例として、近年明らかにされた内因性リパーゼ活性のインヒビターが挙げられる。ANGPTL (angiopoietin-like protein) のうち、

ANGPTL3 は血管内皮リパーゼ (EL, endothelial lipase) のインヒビターであり、ANGPTL4 は LPL のインヒビターであるとされている。これらの蛋白はヘパリン結合性で血中に 0.5  $\mu$ g/mL 程度存在する。ANGPTL4 を投与すると LPL 活性が抑制され、血中 TG が増加する。また、ANGPTL4 のグルタミン酸>リジン置換 (E40K) 多型は欧州アメリカ人の 3% で認められ、低 TG 高 HDL 血症の表現型を呈することが報告されている (Romeo, Hobbs, Cohen et al. Nat Genet 2007)。よって、日本人においても独自の変異による ANGPTL4 低下による LPL 活性亢進により、低 TG 血症兼高 HDL 血症を呈する可能性があると考えられた。反対に、ANGPTL3 と HDL-C は正相関関係を示すことから (Shimamura et al. ATVB 2007; Jin, Rader et al. Cell Metabolism, 2007), ANGPTL3 高値や機能亢進型の変異は EL 活性を低下させて高 HDL-PL 血症の成因となると着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では CETP 遺伝子解析や血漿 CETP 値低下から CETP 欠損である可能性が除外された高 HDL 血症症候群において、新たな遺伝的成因を同定し、その表現型を解明することを目的とする。内因性リパーゼインヒビターであるアンジオポエチン様蛋白 (ANGPTL) 3, 4 遺伝子解析を HDL の量的異常症を対象にして検討することを目指した。

## 3. 研究の方法

45 例の CETP 欠損を除外した高 HDL 血症 (HDL-C 60 mg/dL 以上) 及び 5 例の低 HDL 血症 (HDL-C 40 mg/dL 未満) の末梢白血球より抽出した DNA を用いて ANGPTL3 の 7 エキソン、ANGPTL4 の 7 エキソンを対象とし、患者ゲノ

ム DNA を PCR 増幅し、ライトスキャナーを用いた高分解融解曲線分析で変異のスクリーニングを試みた。Hi-Res Melting (高分子融解曲線分析) は二本鎖 DNA に結合すると蛍光を発する色素 LCGreen を用いて PCR 産物の融解 (熱変性) の過程を蛍光強度の変化として捉え、温度-蛍光のデータを解析する。この方法で変異の存在が疑われた例では、直接シーケンス法で塩基配列を確認した。

#### 4. 研究成果

高 HDL 血症を対象に、まず、血漿 CETP 値を測定と CETP 遺伝子の変異スクリーニングを行い、CETP 欠損が除外された症例を対象に ANGPTL3 と ANGPTL4 遺伝子の変異をスクリーニングした。この研究期間に同定された CETP 遺伝子変異は ACB 誌 (2009) および CCA 誌 (2012) に報告した。

血漿 ANGPTL3 値と HDL-C は  $r=0.36$  の正相関関係を示すことを CCA 誌 (2011) に報告した。ACB 誌に報告した高 HDL 血症は CETP 完全欠損にアポ E2/4 表現型と ANGPTL3 高値によると考えられた高 TG 血症を合併していた。

高 HDL 血症および低 HDL 血症において、ANGPTL3 および ANGPTL4 遺伝子には変異を認めなかった。また、高 HDL 血症例 (37 例と 41 例) において、ANGPTL4 遺伝子のエキソン 2 多型 V123M およびエキソン 6 多型 T266M の遺伝子型頻度を一般人 (それぞれ 172 例と 47 例) と比較したが有意差を認めなかった ( $P=0.539$ ,  $P=0.551$ )。結論として、ANGPTL3 または ANGPTL4 の遺伝子異常による LPL 亢進や EL 低下のリパーゼ活性変動により生じた高 HDL 血症は本邦では少ないと考えられた。しかしながら、低 HDL 血症の検討数が少ないため、今後さらに例数を増やして検討し、ANGPTL3 異常の低 HDL 血症における意義を明

らかにしたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

①Ohtani R, Inazu A, Noji Y, Wakasugi T, Miwa K, Tada H, Kawashiri M, Noguchi T, Nohara A, Kobayashi J, Koizumi J, Yamagishi M, Mabuchi H. Novel mutations of cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene in Japanese hyperalpha-lipoproteinemic subjects.

Clin Chim Acta 413:537-543, 2012 査読有

②Nakajima K, Nakano T, Tokita Y, Nagamine T, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Stanhope KL, Havel PJ, Okazaki M, Ai M, Tanaka A. Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons.

Clin Chim Acta 412:1306-1318, 2011 査読有

③Miwa K, Inazu A, Kawashiri M, Nohara A, Higashikata T, Kobayashi J, Koizumi J, Nakajima K, Nakano T, Niimi M, Mabuchi H, Yamagishi M. Cholesterol efflux from J774 macrophages and Fu5AH hepatoma cells to serum is preserved in CETP deficient patients. Clin Chim Acta, 402(1-2): 19-24, 2009 査読有

④Ai M, Tanaka A, Shimokado K, Ohtani R, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Nakano T, Nakajima K. A deficiency of cholesteryl ester transfer protein whose serum remnant-like particle (RLP)-triglyceride significantly increased, but RLP-cholesterol did not after an oral fat load.

Ann Clin Biochem, 46(Pt6): 457-63, 2009  
査読有

〔学会発表〕(計4件)

①Inazu A Newly identified cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene mutations in Japanese hyperalpha-lipoproteinemia subjects. XVI International Symposium on Atherosclerosis, 2012. 3.26, Sydney Convention Center (Australia)

②稲津明広 コレステリルエステル転送蛋白の動脈硬化症に対する意義 シンポジウム「HDL 分子研究の発展とその臨床応用」 第84 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館 2011 年9月22 日(京都府)

③Inazu A Prospect of CETP inhibitor. LVDD's INTERNATIONAL LIPOPROTEIN STANDARDIZATION FORUM, AACC, 2009.7.22, Hyatt Regency Chicago Hotel (USA)

④稲津明広 CETP阻害薬の開発動向 プロジェクト報告 リポ蛋白検査専門委員会 第49 回 日本臨床化学会年次学術集会, 長崎大学医学部, 2009 年9月18 日(長崎県)

〔図書〕(計2件)

①Mabuchi H and Inazu A Human cholesteryl ester transfer protein in human HDL metabolism High Density Lipoproteins, Dyslipidemia and Coronary Heart Disease, 2010 P95-102 Editor Ernst J Schaefer, Springer Science

②Inazu A Plasma cholesteryl ester transfer protein

(CETP) in relation to human pathophysiology

P35-60

The HDL Handbook, Biological functions and clinical implications

Editor Tsugikazu Komoda, 2010

Elsevier

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

稲津 明広 (INAZU AKIHIRO)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号: 80293348

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし