

令和元年6月5日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08955

研究課題名(和文) 高TG, 低HDL血症を中心とした脂質異常症関連遺伝子解析

研究課題名(英文) Genetic analysis of lipid related genes in patients with hypertriglyceridemia and low HDL cholesterolemia

研究代表者

松永 彰 (MATSUNAGA, AKIRA)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：60221587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：TG1000mg/dL以上の23例を解析し、新たに APOB(p.I4533L)、MLXIPL(p.M490I)、NCAN(p.L152M)、TIMD4(p.S264T)を見出した。また、APOA5(p.T184S; p.G185C)、GCKR(p.V103M; c.354+1G>A; p.P446L)、LMF1(p.M159V; p.G410R)、MLXIPL(p.Q241H)、LRP1(p.G813R; p.R2173Q2; p.AN4054L2)などが原因の一つであることが示唆された。重症低HDL-C血症の1例よりABCA1(p.V635fsX658)のホモ接合体変異を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質異常症の原因遺伝子検索は世界中で行われている。しかし、遺伝子変異による影響は人種や地域による偏りも大きいと考えられている。今回我々は成人の日本人を対象として、主に重症の高トリグリセライド血症および低HDLコレステロール血症の遺伝子解析をおこなった。特に重症高トリグリセライド血症については、49遺伝子について詳細なエクソーム解析を行うことができ、貴重なデータを得た。重症低HDL-C血症の1例よりABCA1遺伝子変異p.V635fsX658のホモ接合体変異によるABCA1欠損症を見出した。

研究成果の概要(英文)：The primary goal was to clarify the genetic factors affecting dyslipidemia in Japan. Exome analysis was performed on 23 cases whose serum triglyceride (TG) level exceeded 1000 mg/dL at Fukuoka University Hospital. Genetic analysis of 49 genes that have been reported to be associated with serum TG levels was performed. In this analysis, four novel mutations, APOB(p.I4533L), MLXIPL(p.M490I), NCAN(p.L152M) and TIMD4(p.S264T) were found. Furthermore, according to previous reports and algorithm analysis, it was suggested that GPIHBP1(p.C14F), APOA5(p.T184S; p.G185C), APOE(p.E262K, p.E263K), GCKR(p.V103M; c.354+1G>A; p.P446L), LMF1(p.M159V; p.G410R), MLXIPL(p.Q241H) and LRP1(p.G813R; p.R2173Q2; p.AN4054L2) were part of the causes of hypertriglyceridemia. The genetic analysis of hypo-HDL-cholesterolemia four cases including severe low HDL-cholesterolemia was performed. We found ABCA1 deficiency due to homozygous mutation p.V635fsX658 from one case of severe hypo-HDL-cholesterolemia.

研究分野：脂質異常症、動脈硬化

キーワード：高トリグリセライド血症 低HDLコレステロール血症 遺伝子解析 次世代シーケンサー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノム規模での GWAS 等で、脂質異常症に関連した種々の遺伝子変異が見いだされている。しかし、現在でもこれらの変異だけでは脂質異常症全体のごく一部しか説明できず、この分野において更に多数の遺伝子解析が必要である。そこで、今回の研究ではリポ蛋白測定を行い脂質異常症の特徴を分類した上で、次世代シーケンサーを用いて APOA1, APOA5, APOB, APOC2, APOC3, APOE, LDLR, PCSK9, LDLRAP1, LPL, LIPC, GPIHBP1, ANGPTL3, SCARB1 等幅広い脂質関連遺伝子解析を行い、特に高トリグリセライド(TG)血症および低 HDL コレステロール血症にフォーカスをあて種々の遺伝因子を明らかとすることとした。

### 2. 研究の目的

本邦における脂質異常症、特に高トリグリセライド(TG)血症および低 HDL コレステロール(HDL-C)血症に及ぼす種々の遺伝因子を明らかとすることが主な目標である。

### 3. 研究の方法

福岡大学病院での脂質検査症例を、血清脂質値、リポ蛋白値および臨床経過より WHO 分類 5 型に分類後、特に高 TG 血症および低 HDL-C 血症に注目して解析を行った。血中白血球分画より DNA を抽出し、脂質異常症関連遺伝子の複数遺伝子の変異・SNPs 解析を、次世代シーケンサーを用いたエキソーム解析の手法を用いて解析を行った。また、リポ蛋白系球体症と類似した病態の症例群に遭遇したため、APOE の遺伝子解析を個別に行った。

### 4. 研究成果

#### 1)重症高トリグリセライド血症に関する解析

重症高トリグリセライド血症のため福岡大学病院を受診した患者、または臨床検査室で高トリグリセライドレベルが検出された患者を対象とした。重症高トリグリセライド血症(TG>1000 mg/dL (11.29 mmol/L))を有する 20 歳以上の 23 例について解析を行った。

家族性高カロミクロン血症の遺伝子解析は数多く報告されている。これらの報告の大部分は、肥満、糖尿病、アルコール摂取のある症例を除外し、単一遺伝子異常の解析を目的としていた。しかし、日常診療で遭遇する希な重症高トリグリセライド血症では、これらのリスクを持つ患者が多くを占めている。そこで、今回の研究では、肥満、糖尿病、アルコール摂取などのリスクのある症例を除外せず、対象の遺伝子を拡大して解析を行った。

高トリグリセライド血症との関連が報告された 49 遺伝子について解析した。今回の解析ではアレル頻度が 10% 以下の変異の検索を主に行ったが、既に高トリグリセライド血症との関連が報告されている変異については、アレル頻度の高い変異でも解析した。

今回は、単一遺伝子ホモ接合体または複合ヘテロ接合体に起因する高トリグリセライド血症の症例は観察されなかった。まず、以前より家族性高カロミクロン血症の原因として報告されている LPL, GPIHBP1, APOA5, APOC2, LMF1 についての解析を行った。APOC2 遺伝子の遺伝子変異、SNPs は全く検出されなかった。LPL の遺伝子では、p.S474X のヘテロ接合体が 3 例に認められたのみであった。LPL の p.S474X 変異は、LPL の N 末端付近の変異であり、以前からこの変異では TG 値がむしろ低値となることが報告されている。GPIHBP1 の変異である p.C14F が 11 人の患者に検出され、そのうち 3 人はホモ接合体であった。この変異は解析アルゴリズムでは良性であった。しかし、GPIHBP1 の p.C14F 変異は、正常な LPL 結合活性を示すものの、蛋白レベルは *in vitro* で減少することが報告されているため影響すると考えられた。23 人の患者のうち、16 人がヘテロ接合体 APOA5 遺伝子変異を保有していた。2 人の患者でまれなヘテロ接合体変異 p.T184S が検出された。p.V153M は 10 人の患者でヘテロ接合体として検出。しかし、p.V153M は良性であると報告されており、影響しないと考えられた。p.G185C は 6 人の患者で検出され、そのうちの 1 人はホモ接合体で、2 人は p.V153M との複合ヘテロ接合体であった。p.G185C は高トリグリセライド血症との関連が報告されている。LMF1 遺伝子の変異は 8 人の患者に見られた。p.M159V は、p.P562R との複合ヘテロ接合体として見出された。p.P562R が 6 人の患者に検出され、そのうち 1 人はホモ接合体であった。p.G410R は 2 人の患者からヘテロ接合体として検出され、今回および以前のアルゴリズム解析により疾患原因遺伝子であることが疑われた。APOE 遺伝子の SNPs はトリグリセライドレベルに影響を与えることが知られている。APOE 遺伝子については、SNPs が 10 例で観察された。高頻度 SNPs としては、p.C130R がホモ接合体 1 例を含む 8 症例、p.R176C はヘテロ接合体 1 症例でそれぞれ検出された。APOE(rs429958, p.C130R) は脂質異常との関連が報告されている。ApoE7 となる p.E288K、p.E289K のヘテロ接合体 1 例が検出された。LIPC は、肝実質細胞によって合成される細胞外蛋白質であり、リポタンパク質代謝において重要な役割を果たす肝臓トリグリセライドリパーゼ(HTGL)をコードする。LIPC の p.V95M は、ホモ接合体 1 例を含む 14 症例で検出された。しかし、p.V95M は日本人で頻繁に見られ、高トリグリセライド血症とは関連がないと報告されている。3 つの ANGPTL メンバー、ANGPTL3、ANGPTL4、および ANGPTL8 のすべてが LPL 阻害蛋白質であり、それらのいずれかの欠乏(過剰発現)が低トリグリセライド血症(高トリグリセライド血症)をもたらすことが報告されている。ANGPTL3 遺伝子において、p.Y104H ヘテロ接合体 1 症例が検出された。ANGPTL4 変異は 9 例で検出され、p.V123M と p.T266M のヘテロ接合体はそれぞれ 2 例と 7 例で検出された。ANGPTL8 遺伝子では、9 例で p.R59W が検出され、そのうち 2 例はホモ接合体であった。しかし p.R59W 変異はトリグリセライドレベルに影響を及ぼさず、さまざまな民族グループにおける LDL-C および HDL-C レベルの低下と関連していたことが報告されている。

APOB は、アテローム発生性リポタンパク質の全ての種類に見られるアポリポタンパク質 B をコードする。23 例中 15 例でさまざまな APOB 変異が検出された。新規変異 p. I4533L が、ヘテロ接合体として見出された。6 つのまれな変異、p. R1388H、p. D2065G、p. I2950T、p. N2964S、p. K3232E、p. E3788K がそれぞれヘテロ接合体として検出された。比較的高頻度の変異、p. 12\_15del は、2 つのホモ接合体および p. N2785H との複合ヘテロ接合体を含む 4 症例で発見された。p. N2785H は、複合ヘテロ接合体を含めて 2 症例で発見された。p. 12\_15del は、トリグリセライドレベルに影響を与えることなく、高レベルの APOB および LDL コレステロールと関連していると報告されている。また、p. N2785H は中国人の高脂血症リスクに影響を及ぼさないことが報告されている。MLXIPL は、肝臓におけるグルコース利用および脂質生成を調節する転写因子をコードする。MLXIPL は日本人の血漿トリグリセライドレベルと関連があると報告されている。MLXIPL 遺伝子において、新たな変異 p. M490I がヘテロ接合体として検出された。p. Q241H は、5 症例でヘテロ接合体として見出された。トリグリセライドレベルと MLXIPL の p. Q241H 変異との関連は、英国のヨーロッパ人およびアジア人-インド人を含むゲノムワイド関連研究で報告されている。比較的高頻度変異 p. A358V がヘテロ接合体として 5 例に検出された。p. A358V は、中国人で APOA1 値との関連のみ報告されている。GCKR 遺伝子によってコードされるグルコキナーゼ調節タンパク質は、グルコース濃度に応答してグルコキナーゼの迅速な動員を可能にするアロステリック調節因子である。GCKR 遺伝子については、16 人の患者に 3 種類の SNPs が観察された。よく見られる変異 p. P446L が、6 例のホモ接合体、10 例のヘテロ接合体として検出された。p. P446L はグルコースの取り込みと動員を促進し、de novo トリグリセライド合成の増加をもたらすことが報告されている。ヘテロ接合体の p. V103M と c. 354+1G>A (rs2293573) は、それぞれ 2 症例と 1 症例で検出された。p. V103M は、疾患との関連が解析アルゴリズム (SIFT, PolyPhen-2, FATHMM) で示された。低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 1 (LRP1) は、低密度リポタンパク質受容体 (LDLR) ファミリーのメンバーである。LRP1 はもともと 2 - マクログロブリン-プロテイナーゼ複合体およびアポ E を細胞内に取り込む受容体として同定された。また、LRP1 はシグナル伝達経路において機能し、他の細胞受容体と相互作用する。LRP1 は、いくつかの異なる組織におけるインスリンシグナル伝達およびグルコース恒常性にも関与している。LRP1 遺伝子について、3 つのまれな変異、p. G81R と p. R2173Q が各 1 例、p. Y4054F が 2 症例においてヘテロ接合体として検出された。解析アルゴリズム (PolyPhen-2, Mutation Taster, FATHMM) は、これら 3 つの変異が疾患を引き起こす可能性を示した。ニューロカン - 軟骨中間層タンパク質 2 (NCAN-CILP2) 領域は、19 番染色体上で 300kb にまたがり、緊密な連鎖不平衡ブロックを形成している。GWAS を通じて、血漿脂質レベルに関連する多くの遺伝子変異が同定されており、その中で NCAN-CILP2 領域は高い統計的有意性および LDL コレステロールおよびトリグリセライド値に対する対立遺伝子あたりの比較的大きな効果が示されている。2 つのまれなヘテロ接合体変異、p. A579G および p. R1142W が、CILP2 遺伝子中に見出された。NCAN 遺伝子について、新規変異 p. L152M および 2 つのまれな変異、p. P92S および p. S838N がヘテロ接合体として検出された。T 細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン 4 (TIMD4) 遺伝子は 5 番染色体上に位置し、免疫応答の調節において重要な役割を果たす T 細胞免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン遺伝子ファミリーのメンバーである。異なる集団で行われた GWAS および他の研究は、TIMD4 変異が血清脂質形質と関連していたことが報告されたが、その関連は一致していない。TIMD4 遺伝子については、新規変異 p. S264T およびまれな変異 p. E216K がそれぞれ 1 症例および 2 症例においてヘテロ接合体として検出された。XKR6 は詳しい報告が殆どされていない。XKR6 遺伝子のまれな変異である p. A103S のヘテロ接合体 1 例が検出された。最近まで、重症高トリグリセライド血症の患者に関する遺伝学的研究の大部分は、LPL、APOA5、APOC2、GPHLBP1、および LMF1 という主に LPL 分子制御遺伝子に焦点が当てられていたが、これらの解析のみでは他の多くの遺伝的原因を無視している可能性がある。本研究では、重症高トリグリセライド血症の 23 人の日本人患者において 49 トリグリセライド関連遺伝子において NGS 解析を行った。今回の解析では、4 つの新規変異体、APOB 遺伝子の p. I4533L、MLXIPL 遺伝子の p. M490I、NCAN 遺伝子の p. L152M と TIMD4 遺伝子の p. S264T を見出した。以前の報告およびアルゴリズム解析により、GPIHBP1 (p. C14F)、APOA5 (p. T184S; p. G185C)、APOE (p. E262K, p. E263K)、GCKR (p. V103M; c. 354+1G>A; p. P446L)、LMF1 (p. M159V; p. G410R)、MLXIPL (p. Q241H)、LRP1 (p. G813R; p. R2173Q2; p. AN4054L2) が高トリグリセライド血症の原因の一つであることが示唆された。しかし、今後の研究では、まだ高トリグリセライド血症と関連付けられていない原因遺伝子がある可能性も考慮する必要がある。

## 2) 低 HDL コレステロール血症に関する解析

低 HDL コレステロール血症については、福岡大学病院を受診した患者より、HDL コレステロール値 30mg/dL 未満で、栄養障害や癌治療中の患者等を除外した 3 例について解析をおこなった。更に HDL コレステロール値 2mg/dL 未満の重症低 HDL コレステロール血症 1 症例についても解析を行った。低 HDL コレステロール血症に関しては、apolipoprotein A-I (APOA1)、lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT)、ATP binding cassette transporter 1 (ABCA1) 等の解析を行い、重症低 HDL コレステロール血症 1 症例が、ABCA1 遺伝子変異 p. V635fsX658 のホモ接合体変異であることを見出した。

## 3) アポ E 関連腎症に関する解析

アポ E の変異は、種々の脂質異常に関係しており、アテローム性動脈硬化症を誘発し、アルツ

ハイマー病を引き起こす。リポ蛋白質系球体症（LPG）およびアポ E2 ホモ接合体系球体症は、アポ E 変異によって起こる腎疾患であり、我々は多数の症例を報告してきた。今回我々は、異なる地域で生まれ、同族関係はみられない 3 症例の腎疾患患者に非常にまれな APOE の同一変異を見出した。ホモ接合体 E2/2 (p.R176C: Arg158Cys) と新規 apoE 変異 apoE Toyonaka (p.S215C: Ser197Cys) ヘテロ接合体との組み合わせの 3 症例は、明らかな免疫沈着なしに膜性腎症（MN）と同様の別の特徴的な組織像を有していた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Kodera, H., Mizutani, Y., Sugiyama, S., Miyata, T., Ehara, T., Matsunaga, A., & Saito, T. (2017). A Case of Lipoprotein Glomerulopathy with apoE Chicago and apoE (Glu3Lys) Treated with Fenofibrate. *Case Reports in Nephrology and Dialysis*, 7(2), 112-120. <https://doi.org/10.1159/000478902>

Sasaki, M., Yasuno, T., Ito, K., Matsunaga, A., Hisano, S., Abe, Y., ... Saito, T. (2018). Focal segmental glomerulosclerosis with heterozygous apolipoprotein E5 (Glu3Lys). *CEN Case Reports*, 7(2), 225-228. <https://doi.org/10.1007/s13730-018-0331-4>

Fukunaga, M., Nagahama, K., Aoki, M., Shimizu, A., Hara, S., Matsunaga, A., ... Saito, T. (2018). Membranous Nephropathy-Like Apolipoprotein E Deposition Disease with Apolipoprotein E Toyonaka (Ser197Cys) and a Homozygous Apolipoprotein E2/2. *Case Reports in Nephrology and Dialysis*, 0004, 45-55. <https://doi.org/10.1159/000487919>

Takasaki, S., Matsunaga, A., Joh, K., & Saito, T. (2018). A case of lipoprotein glomerulopathy with a rare apolipoprotein E isoform combined with neurofibromatosis type I. *CEN Case Reports*, 7(1), 127-131. <https://doi.org/10.1007/s13730-018-0309-2>

Hirashima, H., Komiya, T., Toriu, N., Hara, S., Matsunaga, A., Saito, T., & Muso, E. (2018). A case of nephrotic syndrome showing contemporary presence of apolipoprotein E2 homozygote glomerulopathy and membranous nephropathy-like findings modified by apolipoprotein E Toyonaka. *Clinical Nephrology - Case Studies*, 6(01), 45-51. <https://doi.org/10.5414/CNCS109509>

Kato, T., Ushioji, Y., Yokoyama, H., Hara, S., Matsunaga, A., Muso, E., & Saito, T. (2019). A case of apolipoprotein E Toyonaka and homozygous apolipoprotein E2/2 showing non-immune membranous nephropathy-like glomerular lesions with foamy changes. *CEN Case Reports*, 8(2), 106-111. <https://doi.org/10.1007/s13730-019-00380-w>

〔学会発表〕(計 1 件)

Matsunaga, A., Nagashima, M., Saku, K. Variants of lipolysis-related genes in Japanese patients with severe hypertriglyceridemia. The 83rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Yokohama, March 29-31, 2019

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。