

## 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 6 月 15 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500702

研究課題名（和文）心疾患の危険因子である高トリグリセリド血症の網羅的成因解析システムの開発と応用

研究課題名（英文）Development and the application of a comprehensive cause-analysis system for hypertriglyceridemia that is a risk factor for coronary heart disease

研究代表者

高木 敦子（TAKAGI ATSUKO）

独立行政法人 国立循環器病研究センター・分子薬理部・室長

研究者番号：90179416

研究成果の概要（和文）：

高トリグリセリド(TG)血症は心疾患の危険因子の一つである。高 TG 血症の成因として、循環血中の TG 分解に関与する主酵素であるリポ蛋白リパーゼ(LPL)異常がある。LPL 活性・蛋白低値の高 TG 血症者において、LPL 遺伝子異常の S193R/I194T 複合ヘテロ接合体が見いだされた。LPL 活性・蛋白低値者にもかかわらず、LPL 遺伝子に変異が見つからないケースに関して、血漿中に LPL 阻害物質が見いだされた。この検出にはウエスタン法ではなく、LPL 活性阻害を測定することが必須であることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Hypertriglyceridemia is one of the risk factors for coronary heart disease, and it is caused by an abnormality of lipoprotein lipase (LPL) that is mainly associated with catabolism of triglyceride in the circulation. In fact, we found a compound heterozygous LPL deficiency of S193R/I194T as a cause of hypertriglyceridemia in a subject with the low level of LPL activity and LPL protein. However, there was a case whose LPL gene had no abnormality in spite of the low level of LPL both activity and protein. In this case, we found an inhibitor of LPL enzyme in the patient's plasma. Detection of the inhibitor was done by a combination of the method of measuring inhibitory effect of the plasma on LPL activity and determining a type of the immunoglobulin binding to LPL protein by Western blot method. Measurement of the inhibition of the functional LPL activity by plasma was essential for the detection of inhibitors of LPL enzyme.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学、応用健康科学

キーワード：高トリグリセリド血症・リポ蛋白リパーゼ・動脈硬化・心疾患・自己免疫性疾患・全身性エリテマトーデス

## 1. 研究開始当初の背景

心疾患はがんに次いで日本における死因の第二位を占めており、その予防、診断・治療法の確立は、社会的に重要な課題である。生活習慣病である高トリグリセリド (TG) 血症は心疾患を将来的に引き起こすメタボリックシンドロームの評価項目のひとつでもある。

血清 TG 値は、TG の分解系と合成系によって決定される。国内外で高 TG 血症に導く各種成因因子に関して、我々もふくめて、多くの研究がなされている。TG 分解系はおもに LPL が関与し、LPL 遺伝子変異は世界中で 100 位が報告されている (Merkel M et al, *J Lipid Res* 43:1997, 2002)。LPL 活性のための必須因子としてアポリポ蛋白 CII (Apo CII) が古くから知られ、最近では LPL 活性促進因子であるアポリポ蛋白 AV (Apo V) も報告されている (Schaap FG et al, *J Biol Chem* 279:27941, 2004)。また、LPL に対する自己抗体等が血中に存在することで、高 TG 血症者がひきおこされることも報告されている (Kihara S et al, *New Engl J Med* 320: 1255, 1989)。TG の合成系に関しては、主に環境因子からの研究がなされている。最近、ゲノムの網羅的研究から 5 つのゲノム領域 (7q11: *TBL2* と *MLXIPL* の近傍、8q24: *TRIB1* の近傍、1q42: *GALNT2* 内、19p13: *CILP2* と *PBX4* の近傍、1p31: *ANGPTL3* 近傍) が TG 値と関連することが報告されている (Kathiresan S et al, *Nature Genetics* 40:161, 2008)。これらの機能解析がなされれば、TG 分解系への関与か、TG 合成系への関与かのどちらかに分類されると思われる。しかしながら、高 TG 血症の網羅的成因解析システムの構築は、なされていない。

我々は、高 TG 血症の成因を解明するために LPL 蛋白定量法 (ヒト LPL モノクローナル抗体 2 種でのサンドイッチ ELISA 法) と活性定量法を開発した (Ikeda, Y, Takagi A et al, *Biochim Biophys Acta* 1003:254, 1989・Ikeda, Y, Takagi A et al, *J Lipid Res* 31:1911)。

これら測定系と遺伝子解析法により、原発

性 IV 型の高 TG 血症 (空腹血清 TG 値が正常上限値である 150mg/dl 以上で 300 mg/dl 位の状態) は LPL 蛋白量が正常の半分程度になる LPL 遺伝子変異ヘテロ接合体が遺伝背景にあり、そこに肝臓での TG 合成亢進因子であるアルコール多飲癖や運動不足によるインスリン抵抗性といった粗悪な生活習慣 (環境要因) が負荷して発症する事を明らかにしている (Takagi A, Ikeda Y, *J Clin Invest* 89:581, 1992 他)。

LPL 変異は民族特異的であるので、我々は、日本人における LPL ヘテロ者の簡便な同定のために、日本人の LPL 変異を集積してきた。高 TG 血症者の LPL 蛋白 (活性と高い相関) を測定し、正常の 50% 以下の場合、LPL 遺伝子解析をしている。現在、LPL 機能を失う日本人の変異として 25 種類が見出されている (4 種類は日本の他施設でのみ検出)。

日本人において集積されてきた LPL 変異を用いて、吹田市 (大阪府) 一般住民の性と年齢の階層毎の無作為抽出による (ミレニアムプロジェクトでの吹田研究) 検体 (3650 名) に対して、これら LPL 変異の有無を調べた。その結果 3650 名から十数名の LPL 変異のヘテロ接合体者が検出された。興味ある結果として、LPL ヘテロ者と LPL 正常者の高 TG 血症になりやすさを調べた結果、LPL ヘテロ者中半数以上が高 TG 血症であり、LPL 正常者中、約 20% が高 TG 血症であった。高 TG 血症に導く環境危険因子を解析した結果、肥満 (男性のウエスト  $\geq 85$  cm、女性のウエスト  $\geq 90$  cm) などが、血清 TG 値の上昇に関与していた。LPL ヘテロ者の場合、軽度の環境危険因子の負荷により、容易に高 TG 血症を発症し、その発症頻度は、LPL 正常者と比較して、数倍高 TG 血症になりやすいことが判明した。このことは高 TG 血症発症において、TG 分解系に関与する LPL の機能が重要であることを示している (論文投稿準備中)。これらの結果は、LPL ヘテロ者に対して、環境危険因子の負荷がない場合、正脂血症であるが、LPL 正常者では高 TG 血症を発症しない程度の環境危険因子でも、LPL ヘテロ者は高 TG 血症を発症することを

意味している。つまり、日本人において、少なくとも数十万人が LPL ヘテロで将来の高 TG 血症への危険があることになる。さらに、LPL ヘテロ者は LPL 正常者よりも環境危険因子に関して厳しい節制を守る必要があり、このことは、LPL ヘテロ者ということが高 TG 血症を発症する以前からわかっているならば、その人に見合った生活習慣病の予防（テーラーメイド予防）をすることができるということを意味している。

高 TG 血症と心疾患の関連を解析した結果、高 TG 血症は、高血圧と共に心疾患の独立危険因子と判明した（論文投稿準備中）。

これら大規模の日本人対象者における研究成果より、LPL ヘテロ者の様な LPL 低値者は、LPL 正常者より数倍も高 TG 血症になりやすく、高 TG 血症と高血圧との合併により、数倍も心疾患になりやすいことが明らかとなった。LPL 低値にもかかわらず、従来法によって LPL 遺伝子変異が検出されないことを経験し、高 TG 血症の網羅的成因解析システムの開発への着想に至った。

## 2. 研究の目的

心疾患の危険因子の一つである高トリグリセリド(TG)血症の成因を網羅的に解析できるシステムの構築を目的とする。おもに、血清 TG 値は、TG 分解の主酵素であるリポ蛋白リパーゼ(LPL)量によって調節されている。LPL 遺伝子異常(ヘテロ型)に伴う LPL 蛋白が低値(LPL 正常値の 50%以下)を示す場合、肝臓の内因性 TG 合成を促進する環境危険因子の負荷により、対象者は中程度の高 TG 血症になる。しかし、LPL 蛋白低値にもかかわらず、LPL 遺伝子に変異が見つからないケースに関して、その高 TG 血症の病因解明を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 対象者： 所属施設、及び他施設からの高 TG 血症者の解析依頼があったものを対象者とする。所属施設および、依頼施設の倫理委員会の承認後、対象者から同意を文書でいただいた。

(2) LPL 活性、蛋白の解析： LPL 活性測定は選択的免疫抑制法で、LPL 蛋白測定はサン

ドイッチ法で行った。

LPL 遺伝子の解析： LPL 活性、蛋白低値者に関し、LPL 遺伝子解析を直接塩基配列決定法により行った。

特にヘテロ接合体および複合型ヘテロ接合体は直接塩基配列決定法で見逃す可能性もあるので、single strand conformation polymorphism (SSCP)法も行った。変異が見いだされない場合には、原因変異側のアレルのプライマーとアニールする部位に多型があり、原因変異を含む部分が PCR 増幅されないため、変異を見逃している可能性もあるので、プライマーの設定位置を外側にずらした nested primers を使用した遺伝子解析も行った。

見出された変異は、それが LPL 機能を失わせる原因変異か否かを、部位特異的変異導入法で作成した変異 LPL cDNA を COS1 細胞に、導入して、発現させることによって調べた。

(3) LPL に対する自己抗体の検出：ヒト精製 LPL を 12.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動、膜にトランスファーし、ブロッキング後、患者血漿を一次抗体として、室温 1 時間反応、標識抗ヒト IgA, IgE, IgG, IgM 抗体等を二次抗体として、室温 1 時間反応後、アビチン・ビオチン複合体形成により増幅後、化学発光によりバンドを LAS4000 にて検出した。

血漿による LPL 阻害効果の検出：ヒト精製 LPL の活性を、精製ヒト apoCII 存在下で、3H-トリオレイン-アラビアゴム懸濁粒子基質で測定する際に、患者血漿を添加して、LPL の活性の抑制程度をみることで調べた。

## 4. 研究成果

(1) LPL 遺伝子自体に変異がある場合

① 大きな欠損や付加変異の存在の検討。我々が見いだした LPL 遺伝子 5' 上流からイントロン 1 の途中を含む約 54 kb 欠失変異について、簡便検出系により、高脂血症者 90 名で、その変異の有無を調べたが、この変異は見いだされなかった。日本人の LPL 変異としては稀な変異であると考えられた。

② 高 TG 血症者(G567: 5 歳男児、TG 622 mg/dl, TC 266 mg/dl)は、LPL 活性がほぼゼ

ロである、LPL 完全欠損症であり、新規変異 S193R と既知変異 I194T の複合型ヘテロ接合体であることがわかった（論文投稿準備中）。

S193R 新規変異は SSCP 法及び、制限酵素 *Bsa*BI で検出可能である。

## (2) LPL 遺伝子自体には変異がない場合

自己免疫性疾患の一種で全身性エリテマトーデス患者 (G571) を経験した。患者は血清 TG 値が 10,000mg/dl 以上の高 TG 血症を呈しており、LPL 活性および蛋白とも検出できなかった。

患者の LPL 遺伝子は正常であったので、LPL に対する自己抗体ができていたものと考えられた。

LPL に対する自己抗体検出のためのウエスタン法のシステムを構築し、調べた結果、LPL に対する自己抗体（主に IgA 型）が産生されていた。なお、血清 TG 水解に関わるもう一つの酵素である肝性トリグリセリドリパーゼに対する自己抗体は産生していなかった。この自己抗体を含む患者血漿は容量依存的に LPL 活性を阻害させた。食事療法と免疫抑制剤であるシクロホスファミドパルス療法に伴って、患者の LPL 活性値および LPL 蛋白量は、次第に正常化し最終的に、発端者の血清 TG 値は 82 mg/dl と正脂血化した。正脂血化に平行して、患者血漿による LPL 活性の阻害は解除された。ところが、ウエスタン法で調べると、治療後、正脂血化した患者血症でも、治療前と同程度の濃さの LPL バンドが検出された。このことは、本 SLE 患者において、LPL に対する抗体（IgA タイプ）は産生されているが、この抗体は、不活性型の LPL と反応する（ウエスタン法による検出）が、LPL の TG 水解活性を阻害できない（活性型 LPL と反応しない）抗体であることを示す。よって、抗ヒト LPL-IgA 抗体は、本 SLE 患者における高 TG 血症の成因にならないことが示唆された。更に、患者血漿から IgA を IgA 抗体により除去しても、LPL 活性阻害作用が残っていた。

この患者において、LPL 活性を抑制して、高 TG 血症を引き起こした真の原因は明らかにできていないが、自己免疫疾患その他 LPL

阻害物質を産生することによって引き起こされる高 TG 血症の診断には、従来のウエスタン法では不適切であることが明らかになった。臨床的に意味のある LPL 阻害物質検出法は、LPL の TG 分解活性を抑制するか、否かを調べる方法が適切であることがわかった。本患者の真の LPL 活性を阻害する因子の解明が必要である。この経験から、高 TG 血症への成因となる自己抗体の存在確認はウエスタン法ではなく、LPL 活性阻害を評価する方法でしか、臨床的に意味のあるものにならないと考えられる。LPL 活性阻害因子は LPL に対する自己抗体以外にも ANGPTL3, ANGPTL4 蛋白なども知られているので、SLE に限らず高 TG 血症の原因としての LPL 活性阻害因子の存在の、臨床的に意味のある簡便な評価系の確立が、高 TG 血症の成因解析のために必要であると思われる。

## 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 1 件）

### ① 高木敦子、池田康行

リポ蛋白質リパーゼ (LPL) ・肝性トリグリセリドリパーゼ (HTGL) .

広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査一その数値をどう読むか [第 7 版] IV. 生化学的検査 [2] A. 脂質関係 日本臨床 67 巻増刊号、2009、443-450 (査読無)

〔学会発表〕（計 7 件）

### ① 荒木まり子、石原正行、高杉尚志、藤枝幹也、脇口宏、高木敦子、池田康行

抗lipoprotein lipase抗体により高脂血症を伴ったSLEの10歳女児例

第21回日本小児リウマチ学会総会

2011年10月16日

神戸・神戸国際会議場

### ② Atsuko Takagi, Yasuyuki Ikeda, Mariko

Araki, Taku Morita, Masayuki Ishihara,

Manabu Matsumoto, Hisashi Takasugi,

Akihiko Maeda, Takanori Abe, Mikiya

Fujieda, and Hiroshi Wakiguchi.

Hypertriglyceridemia (HTG) caused by

autoantibodies to lipoprotein lipase (LPL) in a patient with systemic lupus erythematosus (SLE)

第43回 日本動脈硬化学会大会

2011年7月16日

札幌・ロイトンホテル

③ 高木敦子、池田康行、荒木まり子、森田拓、石原正行、松本学、高杉尚志、前田明彦、阿部孝典、藤枝幹也、脇口宏

高トリグリセリド血症発症の病因としてのリポ蛋白リパーゼ(LPL)に対する自己抗体産生

第83回 日本生化学会大会&第33回 日本分子生物学会大会(合同大会)

2010年12月10日

神戸ポートアイランド(神戸)

④ Y. Ikeda, A. Takagi, N. Iwai, Y. Kokubo, and H. Tomoike.

Environmental risk factors leading to hypertriglyceridemia on heterozygous lipoprotein lipase (LPL) deficiency identified in the general population of Japanese.

78<sup>th</sup> European Atherosclerosis Society Congress

2010年6月23日

Hamburg (GERMANY)

⑤ A. Takagi, M. Nagano, T. Iwanaga, N. Ito, H. Hattori, T. Egashira, Y. Ikeda

Identification of compound heterozygous deficiency with a novel large deletion (a 54-kb deletion of 5' upper region and a part of intron 1) and y61x of the lipoprotein lipase gene in the Japanese subject

78<sup>th</sup> European Atherosclerosis Society Congress

2010年6月23日

Hamburg (GERMANY)

⑥ 高木敦子、池田康行、岩井直温、小久保喜弘、友池仁暢

日本人一般集団におけるリポ蛋白リパーゼ

(LPL)遺伝子変異(第3報) S447X変異の頻度と諸性質:吹田研究

第82回 日本生化学会大会

2009年10月24日

神戸国際会議場(兵庫県)

⑦ 荒木まり子、森田拓、石原正行、松本学、高杉尚志、前田明彦、阿部孝典、高木敦子、池田康行、藤枝幹也、脇口宏

高脂血症を合併したSLEの1例

第44回 日本小児腎臓病学会学術集会

2009年6月27日

一橋記念講堂・学術総合センター(東京)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高木 敦子 (TAKAGI ATSUKO)

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子薬理部・室長

研究者番号: 90179416

### (2) 研究分担者(H21→H22)

池田 康行 (IKEDA YASUYUKI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子薬理部・客員研究員

研究者番号: 90176107