

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500883

研究課題名(和文)高トリグリセリド血症の網羅的成因解析法の開発と応用：非遺伝子変異因子を中心として

研究課題名(英文)Development and its application of the comprehensive analysis system to hypertriglyceridemia: mainly on nongenetic factors

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・研究所・室長

研究者番号：90179416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：高トリグリセリド(TG)血症は心疾患危険因子で、成因に血中TG分解酵素リポ蛋白リパーゼ(LPL)異常等がある。LPL低値の成因をLPL変異や関連遺伝子変異、非遺伝因子に関し検討した。LPL低値の高TG者でLPLエキソン5の1塩基欠失ヘテロが同定された。LPL低値であるがLPL遺伝子正常の高TG者2名で、LPLの作用場への移行のための蛋白GPIHBP1の遺伝子エキソン1に非同義変異が同定されたが、機能に影響ない多型であった。LPL遺伝子は正常な自己免疫疾患の高TG者から血中にLPL活性阻害するIgA型LPL自己抗体が検出された。非遺伝因子の自己抗体等LPL活性阻害物質の簡便な評価系を構築した。

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. Causes of LPL abnormality were examined on the point of LPL gene, other genes and nongenetic factors associated with LPL function.

A hypertriglyceridemic subject-1 with low LPL mass exhibited one base deletion on exon 5 of LPL gene, leading to abnormal LPL. Two-hypertriglyceridemic subject-2 and 3, whose LPL genes were normal, were examined for GPIHBP1 gene associated with LPL function, and both of them showed a nonsynonymous mutation of T to G on exon 1, respectively. A hypertriglyceridemic subject-4 with low LPL mass due to autoimmune disease was normal in LPL gene, but her hypertriglyceridemia was caused by an autoantibody of IgA type inhibiting LPL activity. In this study, we developed a simple system for the detection of autoantibodies inhibiting LPL activity.

研究分野：分子遺伝学 リポ蛋白代謝学

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 自己免疫疾患 全身性エリテマトーデス

1. 研究開始当初の背景

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であり、心疾患危険因子である。血清 TG 値は、TG の分解系と合成系により決まる。分解系は主にリポ蛋白リパーゼ(LPL)が関与する。我々は、高 TG 血症の成因解明のため、LPL 蛋白定量法(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で、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~300 mg/dl 位)は LPL 蛋白量が正常の半分になる 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 変異は民族特異的なので、我々は、日本人での LPL ヘテロ接合体者の簡便な同定のため、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は約 25 種類見出されている。

日本人で集積された 25 種類の LPL 変異検出方法を用いることで、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(吹田研究)検体(3650 名)から LPL 変異ヘテロ者を 11 名検出できた(0.3%)。LPL 変異のヘテロ者は正常者と比して、5 倍高 TG 血症になりやすいことが判明した(オッズ比 4.99、95% CI: 1.52 - 16.41)。環境因子として、肥満、高アルコール摂取、及び高血糖状態が、血清 TG 値上昇に相加的に関与した。LPL ヘテロ者は LPL 正常者よりも、軽い環境因子の負荷で高 TG 血症を呈することが判明し、環境因子に関して厳しい節制を守る必要がある。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にわかれば、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)が可能であることを意味する。高 TG 血症(オッズ比 1.46、95% CI; 1.01-2.11)は、高血圧(オッズ比 1.90、95% CI; 1.35-2.68)と共に心疾患の独立危険因子であった。これら大規模の日本人対象者での研究成果より、LPL ヘテロ者は高 TG 血症になりやすく、心疾患になりやすいこと(11 名の LPL ヘテロ者中 6 名の高 TG 血症者に 1 名の心筋梗塞経験者がいた)が明らかとなった。

心疾患の危険因子減少のため、高 TG 血症の網羅的成因解析システムの開発が必要と考え、研究を進めた。この過程で、LPL 低値にもかかわらず、LPL 遺伝子変異が検出されないケースを経験した。この一例として、LPL に対する阻害因子による LPL の不活化のため、高 TG 血症になった患者を経験した。この患者は、自己免疫疾患の全身性エリテマトーデス(SLE)で、LPL 活性も蛋白も検出されず、血清 TG が 1000 mg/dL 以上を示した。本患者は、一般的な抗体の有無の検出に使用されるウエスタン法により、血漿中に抗ヒト LPL-IgA 抗体が検出された。SLE の治療により、LPL 蛋白量と血漿 TG 値は正常化した。しかしウエスタン法では、治療前と治療後も、同様の濃さの抗ヒト LPL-IgA 抗体バンドが検出され、ウエスタン法では、SLE 患者の治療後の正脂血化の理由を説明するのは、困難性を伴うことがわかった。LPL 活性阻害の測定では、SLE 患者の治療後の正脂血化を良く説明できた。それ故、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た。

2. 研究の目的

本研究は、心疾患の危険因子である高 TG 血症の原因を網羅的に解析できるシステム構築を目的とする。血清 TG 分解主酵素である LPL 蛋白低値の場合、LPL 遺伝子異常があり、この遺伝背景に環境因子が負荷し、高 TG 血症となるが、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も経験している。LPL 蛋白低値の成因を LPL 遺伝子変異やその他関連遺伝子変異、そして、非

遺伝因子に関して検討することを目的とした。

更に、非遺伝子因子として、血液中の LPL 活性を抑制する阻害因子の臨床的に意味のある簡便な測定系の確立を目的とした。

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、GPIHBP1、LMF1、APOC2 他の遺伝子の解析： 直接塩基配列決定法により行った。

(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 遺伝子変異に関して

血清 TG 値 552 mg/dL を示す高 TG 者 (1 歳女児) において、LPL 遺伝子変異 (エキソン 5 の 1 塩基欠失で Takagi A, Ikeda Y, *J Clin Invest* 89:581, 1992 と同じ変異) のヘテロ接合体が同定された。この変異は母由来であった。母も本変異のヘテロ接合体者であるが、肝臓での TG 合成亢進をおこすアルコール多飲等の負荷因子がないため、正脂血であるが、同じヘテロ接合体で、同様に肝臓での TG 合成亢進をおこす負荷因子がみいだせない患児で、高 TG 血症である原因は不明である。LPL 活性促進因子である ApoC2 蛋白の遺伝子

にも原因となる変異は患児において、みいだされなかった。

(2) LPL 遺伝子以外の LPL 蛋白合成、輸送、発現に関わる遺伝子の変異に関して

血清 TG 値 1500 mg/dL を示す高 TG 者 (G596_8 ヶ月女児) および、血清 TG 値 3000 mg/dL を示す高 TG 者 (G575_6 歳女児) において、LPL 蛋白低値であるが LPL 遺伝子は正常であった。LPL 遺伝子以外の遺伝子変異として、LPL 蛋白を合成場から作用場へ移行する蛋白 GPIHBP1 の遺伝子に関して、エキソン 1 に T G の非同義変異が見いだされた。この変異は LPL 蛋白値正常の正脂者 13 名中、T/G 7 名、G/G 6 名あり、機能に影響ない多型と考えられた。

(3) 非遺伝因子に関して

自己免疫疾患の全身性エリテマトーデス (SLE) で、重度の高 TG 血症であるが、LPL 遺伝子には変異が見いだされない患者の解析を行なった。血中に LPL 活性を阻害する IgA 型の LPL 抗体が検出された。ウエスタン法で IgA 型の LPL の自己抗体が患者血中にあることは以前にわかっていたが、SLE の治療により、TG 値が正常になっても、同じ濃さのバンドが検出されていたので、ウエスタン法の結果からは、高 TG 血症の原因が確定できていなかった。患者の高 TG 血症時の血漿から、IgA を分離、精製し、それを精製 LPL に添加して、抑制をみることで、確定できた。

(4) LPL 活性阻害因子の存在の評価系の確立

ウエスタン法では、LPL に対する自己抗体等病因となる LPL 阻害物資の有無の判定はできないことを明らかにしていたので、LPL 活性阻害の測定が重要であるため、簡便で多検体処理可能な LPL 活性阻害の測定系開発を目指した。活性のある LPL 蛋白として、サル腎臓由来株化細胞 COS1 で組換え His6 タグつき LPL 蛋白を得ることを試みた。細胞からへパリンで遊離されてすぐの画分が最も比活性が高いことがわかった。

一般的 LPL 活性測定は、放射性 TG を基質にしているが、放射性同位元素管理区域外で

も測定可能とするため、蛍光基質での LPL 活性測定系構築を行った。精製 LPL 及び、ヘパリン静注後血漿中の LPL について、酵素量、反応時間依存的蛍光強度が得られた。以上により、放射性同位元素を使用しない簡便で多検体測定可能な LPL 活性阻害の測定系が構築できた。

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2件)

高木敦子、池田康行.

II. 脂質代謝、動脈硬化における機能と臨床的意義 1. リポ蛋白リパーゼ.

In: 特集 リパーゼの臨床的意義.

The Lipid 第24巻 第4号(通巻112号)
p.334-344 (2013) メディカルレビュー社.
(査読無)

高木敦子、池田康行.

高トリグリセライド血症の遺伝子診断-LPL 遺伝子変異診断を中心に-

In: 特集 高トリグリセライド血症-高トリグリセライド血症の最新知見-

日本臨床 第71巻 第9号(通巻1045号)
p.1569-1576 (2013) 日本臨床社. (査読無)

[学会発表](計8件)

Atsuko Takagi, Yasuyuki Ikeda, Kuniyoshi Kobayashi, Ken-ichi Hirano.
Development of human adipose triglyceride lipase (ATGL) specific measurement system: production of rabbit anti-human ATGL antibody neutralizing ATGL activity
The 3rd International Symposium on Triglyceride Deposit
Cardiomyovascularopathy and Neutral Lipid Storage Disease. 14th March. 2015, Tokyo, Japan.

杉山沙織、斐成寛、篠崎聖児、高木敦子、池田康行、具嶋敏文、高橋和弘.
高中性脂肪血症により急性膵炎を発症したリポ蛋白リパーゼ機能低下症の1例.
消化器病学会・九州支部例会 104 回例会

2014年12月5-6日 大分オアシスタワーホテル・ソレイユ.

高木敦子、池田康行.

日本人でのリポ蛋白リパーゼ(LPL)遺伝子変異カタログの構築とその利用.

第17回 日本心血管内分泌代謝学会
2013年11月22-23日 大阪・ライフサイエンスセンター.

高木敦子、池田康行、小林邦久、平野賢一.

脂肪細胞トリグリセリドリパーゼ(adipose triglyceride lipase; ATGL)の生化学的特徴について.

第86回 日本生化学会大会 2013年9月11日 - 13日 パシフィコ横浜.

高木敦子、池田康行.

日本人でのリポ蛋白リパーゼ(LPL)遺伝子変異カタログ:種類・特徴・変異検出への応用.

第45回 日本動脈硬化学会大会 2013年7月18日 京王プラザホテル.

Atsuko Takagi, Yasuyuki Ikeda, Kuniyoshi Kobayashi, Ken-ichi Hirano.
The biochemical characterization of human adipose triglyceride lipase (ATGL) and development of its specific measurement system: a property of his6-ATGL expressed in COS1 cells.

The 2nd International Symposium on Triglyceride Deposit

Cardiomyovascularopathy and Neutral Lipid Storage Disease
19-20th April, 2013 at Osaka University Nakanoshima Center.

高木敦子、池田康行.

高トリグリセリド(TG)血症病因診断のためのリポ蛋白リパーゼ(LPL)、肝性トリグリセリドリパーゼ(HTGL)活性の簡便な測定系の開発.

第85回 日本生化学会大会 2012年12月14日-16日 福岡・福岡国際会議場.

高木敦子、池田康行、鈴木重雄.

リポ蛋白リパーゼ(LPL)遺伝子エキソン 5 上

の新規変異 S193R (C834G)と 既知変異 I194T (T836C)の高トリグリセリド血症者からの同定 .

第 44 回 日本動脈硬化学会大会 2012 年 7 月
20 日 福岡・ヒルトン福岡シーホーク .

〔図書〕(計 1 件)

高木敦子、池田康行、鈴木 朗、平野賢一、HTGL 欠損症

In: 先天代謝異常ハンドブック (遠藤文夫、奥山虎之、大浦敏博、山口清次 編)
山中書店、p.392-393 (2013).

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
ー・研究所・室長

研究者番号 : 90179416