

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790934

研究課題名(和文) 高度高中性脂肪血症における ApoAV 遺伝子変異の意義

研究課題名(英文) The significance of ApoAV (Gly185Cys) in severe hypertriglyceridemia

研究代表者

永山 大二 (NAGAYAMA, Daiji)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：50385829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究は ApoAV 及びその変異が脂質代謝に及ぼす影響を明らかにし、高度高 TG 血症の治療に寄与する事を目的とした。

抽出した血清 VLDL における LPL 加水分解反応を調べた結果、ApoAV 変異陰性者、変異陽性者(ヘテロ)、変異陽性者(ホモ)の順番に低下し、血清 ApoAV 濃度も低値だった。ApoAV 変異では LPL 反応に必要な ApoA5 (ApoA5) の TGRL 分画量が低下し TGRL の性質が変わる可能性がある。

ApoAV 変異陰性者由来の ApoA5 は低濃度にて LPL による TG の加水分解反応を若干亢進させたが、中～高濃度にて抑制した。今後変異陽性者でも検討を重ねる。

研究成果の概要(英文)：ApoAV mutation (G185C) is frequently observed in severe hypertriglyceridemia. This study aimed to clarify the effect of ApoAV on lipid metabolism, and to contribute to the treatment of severe hypertriglyceridemia.

The lipolytic activity using extracted VLDL and concentration of serum apolipoprotein A5, coded by ApoAV, was decreased in order ApoAV mutation negative individuals, mutation-positive (hetero), mutation-positive (homo). Therefore, ApoAV mutation might contribute to the decrease in sensitivity for lipolysis through decreasing partitioned apolipoprotein A5 in TG rich lipoprotein.

Apolipoprotein A5 derived from subjects without ApoAV mutation slightly accelerated lipolytic activity in vitro. Further examination for ApoAV mutation are needed in the future.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 代謝学

キーワード：ApoAV 高度高 TG 血症

### 1. 研究開始当初の背景

高度高 TG 血症は重症急性膵炎の原因となることが知られている。この脂質異常によって生じる膵炎は比較的若年者に多く認められる傾向にあり、重症化し死亡に至る例もある。膵炎と関連する高 TG 血症は高カイロミクロン血症であり、WHO 分類上では Ⅰ型(カイロミクロンが増加)、Ⅱ型(カイロミクロンおよび VLDL が増加)に相当する。その病態に関しては諸説あるが、その一つとして膵房細胞内で過剰に蓄積した TG に由来する遊離脂肪酸がカルシウムイオンと結合することによって、各種酵素が活性化、膵房細胞の細胞膜と実質の障害が起こるという Havel の説が挙げられる。しかし、高カイロミクロン血症をきたす背景の病態や、脂質代謝の異常が膵炎を引き起こす直接の要因についてはまだ不明な点が多い。高度高 TG 血症に併発する急性膵炎は重症化しやすく、治療法もインスリンやヘパリン投与など特異的な手段が必要となるケースがある。またその背景には、糖尿病や飲酒、妊娠といった日常診療で高頻度に遭遇する因子以外の要因が関連しているものと推測されている。

一般に高度高 TG 血症の成因として、通常過食による合成亢進に加え、その根底には血中の TG 水解酵素であるリポ蛋白リパーゼ (Lipoprotein lipase; LPL) の作用低下が考えられる。LPL は血管内皮細胞表面に係留し、血中のカイロミクロン、超低比重リポ蛋白 (VLDL) に含まれる中性脂肪を水解する酵素で主に脂肪細胞で合成され、活性発現に補酵素としてのアポ蛋白 C- (ApoC) を必要とする。水解に関わる他の諸因子として、LPL の成熟に関わるとされる Lipase maturation factor-1 (LMF-1) や LPL の血管内皮細胞表面への係留に関連する蛋白と考えられている Glycosyl phosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1)、LPL の拮抗因子と考えられる Angiopoietin like-3 (Angptl3) が挙げられる。実際に、血清 TG 値 1000mg/dl 以上を呈するような高度高 TG 血症例では、LPL 自体の遺伝子異常のほか、ApoC の欠損、LMF-1 や GPIHBP1 の遺伝子変異を有したり、Angptl3 が異常高値である例が認められることが分かっている。

しかし、当施設で今までに高度高 TG 血症 60 例の病態解析を行なった結果、LPL 遺伝子の異常を認めた例は全体の 12%に過ぎなかった。LMF-1、GPIHBP1 遺伝子変異は認められず、ApoC 欠損例もなかった。血清 Angptl3 濃度は正脂血症群と比較した平均値は高かった (270vs.414ng/ml)ものの、TG 値との解離を示す例も多かった。しかし、60 例中 32 例 (53%) で、アポ蛋白 A-V(ApoAV) の遺伝子変異 (G185C) が検出された (Homo8 例、Hetero24 例)。この変異は正脂血症例では 2.4%の出現率であった。また、ApoAV 遺伝子変異を有する例では、ヘパリン静注後の血清 LPL 蛋白量は低

下していないにも関わらず、LPL 活性 (遊離脂肪酸にて測定) の低下を示す例が多かった。ApoAV は従来複数の遺伝子変異が報告されており、その一部は家族性に生じる高 TG 血症に關与する可能性があることが分かっているが、その詳細は不明である。これらの結果から、高度高 TG 血症においては水解反応を起こす主たる酵素である LPL 自体の異常が原因であるものはごく一部で、LPL 反応異常に ApoAV の変異が大きく關与している可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

急性膵炎を惹起する高度高中性脂肪血症の原因は定かでないものが多い。その病態への關連が深いと考えられる ApoAV 変異を認めた症例の解析を行い、患者血清から精製分離したアポリポタンパク A5 (ApoAV によってコード) が水解反応へ与える影響や、その意義について明らかにすることを本研究の目的としている。

### 3. 研究の方法

当院及び他施設から依頼のあった高度高 TG 血症症例 (血清 TG 値 1000mg/dl 以上) が対象となる。患者血清を用いて検索を行い、ApoAV 変異を有する高度高 TG 血症症例と、変異を有さない症例 (ワイルドタイプ) を抽出する。それぞれの血清から、モノクローナル抗体を用いたアフィニティカラム法にてアポリポタンパク A5 を精製し、invitro の TG 水解系へ添加することで LPL (ヒト由来、あるいはウシミルクを用いる) による水解反応や ApoC への影響を検討する。また、ApoAV 変異による水解異常を認めた際、どのような条件設定下で水解反応が変化しうるのかを検討する。

また、アポリポタンパク A5 の血中濃度測定や体内分布動態の確認を行うことで、臨床像も含めたアポリポタンパク A5 の存在様式、機能を明らかにしていく。

### 4. 研究成果

高度高 TG 血症例 60 例の過半数にあたる 32 例において ApoAV 変異 (すべて G185C) を認めた。ApoAV 変異が高度高 TG 血症の発生と密接にかかわっている可能性が高いといえる。高 TG 血症例の血清中 VLDL を抽出し、血清 TG 濃度で補正した上で LPL 加水分解反応を調べた結果、ApoAV 変異陰性者、変異陽性者 (ヘテロ)、変異陽性者 (ホモ) の順番に反応が低下していた。このことから、ApoAV 変異は TGRL の性質を変えることで LPL 反応を阻害している可能性が示唆された。また、同時に血清中のアポリポタンパク A5 濃度を (血清 TG 濃度で補正し) 測定した結果、ApoAV 変異陰性者、変異陽性者 (ヘテロ)、変異陽性者 (ホモ) の順番に濃度は低かった。このことから、ひとつの機序として「ApoAV 変異例では本来 LPL 反応に必須なアポリポタンパク A5 が TGRL に分画

しにくくなる」ということが高TG血症の発症に  
関与している可能性が示唆された。  
さらに、高度高TG血症例由来の血清を用い、  
アフィニティカラム法を用いてアポリポタン  
パクA5を抽出し、in vitroの実験系にてTG  
の加水分解反応に与える影響を検討した。ApoAV  
変異陰性である正脂血症例から抽出したア  
ポリポタンパクA5は、反応液中  
0.25-2.5ng/mlの濃度においてLPLによるTG  
の加水分解反応が若干亢進していた。しかし、  
25-250ng/mlの濃度においてはむしろ、濃度  
依存的に反応の抑制がみられるという予期  
せぬ結果が得られ、反応系の条件見直しをし  
ていく必要があるものと思われた。健常者ア  
ポリポタンパクA5において反応の促進、  
ApoAV変異陽性者においては反応が低下する  
ことを確認し、そのうえでApoAV変異に伴う  
加水分解反応低下を回復させるような条件設定  
を模索していくことが、今研究目指す最終的  
なアウトカムである。

#### 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 2 件)

日本臨牀 2013 年 9 月 71 巻 09 号:  
1602-1605

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

高トリグリセライド血症関連疾患の病  
態 1.急性膵炎

永山大二、白井厚治

査読なし

日本臨牀 2013 年 6 月 71 巻増刊号 3:  
166-169

脂質異常症 基礎・臨床研究の最新知見

脂質異常症の臨床

3.原発性脂質異常症の病因・病態・診断・治  
療 (1)原発性カイロミクロン血症

4)その他原因不明の高カイロミクロン血症

永山大二、白井厚治

査読なし

[学会発表](計 6 件)

2014年2月25日 千葉

第3回下総内科産婦人科臨床フォーラム

妊娠時に生じる高度高中性脂肪(TG)血症例  
の特徴

永山大二

2013年5月16日 千葉

第56回日本糖尿病学会

日本人高度高中性脂肪血症におけるApoAV遺  
伝子変異の臨床的意義

永山大二、村野武義、番典子、川名秀俊、  
南雲彩子、大平征宏、齋木厚人、白井厚治、  
龍野一郎

2013年4月14日

第110回日本内科学会 東京

日本人における高度高中性脂肪血症(膵炎合  
併例を含む)の原因検索

永山大二、村野武義、番典子、川名秀俊、  
南雲彩子、大平征宏、齋木厚人、白井厚治、  
龍野一郎

2013年2月2日 宮城

第6回日本性差医学・医療学会学術集会

妊娠時に発症した高度高中性脂肪血症例の  
特徴

永山大二、村野武義、今村榛樹、山口崇、番  
典子、川名秀俊、南雲彩子、大平征宏、遠藤  
溪、齋木厚人、白井厚治、龍野一郎

2013年1月13日千葉

Narita Inzai Sakura Endocrinology  
Conference

妊娠中高度高中性脂肪血症を併発した症例  
の解析

永山大二、村野武義、白井厚治、龍野一郎

2012年4月27日 千葉

第2回千葉糖尿病内分泌代謝研究会

日本人における高度高中性脂肪血症(急性膵  
炎合併例も含む)の原因検索 ~ 中性脂肪分  
解系に作用する諸因子とその意義 ~

永山大二、村野武義、白井厚治、龍野一郎

[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:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

東邦大学医療センター佐倉病院 糖尿病内  
分泌代謝センターホームページ

高度高中性脂肪血症の病態解析を目的とし  
た他施設からの検体受付

[http://www.lab.toho-u.ac.jp/med/sakura/  
metabo/research/medical\\_agency.html](http://www.lab.toho-u.ac.jp/med/sakura/metabo/research/medical_agency.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永山 大二 (NAGAYAMA, Daiji)  
東邦大学・医学部・助教  
研究者番号：50385829

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

龍野 一郎 (TATSUNO, Ichiro)  
東邦大学・医学部・教授  
研究者番号：80282490

白井 厚治 (SHIRAI, Kohji)  
東邦大学・医学部・名誉教授  
研究者番号：00150269