

## 家族性高 HDL 血症における血漿コレステリル エステル転送蛋白に関する研究

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

稲 津 明 広

(平成3年11月1日受付)

血漿高比重リポ蛋白 (high density lipoprotein, HDL) コレステロールは動脈硬化症の防御因子として知られている。近年, 家族性高 HDL コレステロール血症の家系において血漿コレステリルエステル転送蛋白 (cholesteryl ester transfer protein, CETP) 活性の欠損が報告された。血漿 CETP は分子量 74,000 の疎水性糖蛋白であり HDL とその他のリポ蛋白間のコレステリルエステルの転送を司る。CETP に対するモノクローナル抗体を用い, 著明な高 HDL コレステロール血症を示した兄妹につき検討した結果, 血漿 CETP の欠損症であることが確認された。さらに, これらの症例は CETP の構造遺伝子のイントロン14のスプライシングドナーの点変異 (G→A 変異) のホモ接合体であることが確認された。この点変異はメッセンジャーリボ核酸の前駆体 (pre-messenger RNA) の正常なスプライシングを阻害する変異であった。さらに, 国内の4地域 (北陸, 岩手, 広島, 東京) で発見された血縁のない高 HDL コレステロール血症の21家系中9家系において, すくなくとも1つの接合体にこのイントロン14の点変異が同定された。CETP 遺伝子の4つの制限酵素切断長多型性を用いたハプロタイプの検討により CETP 欠損家系の発端者 (5例) は同一のハプロタイプを示し, これらの症例は共通の遺伝的背景を共有している可能性が示唆された。CETP 欠損の5家系の家系構成員を遺伝子診断にて3群 (ホモ接合体, ヘテロ接合体, 正常) に分類しリポ蛋白組成を検討した。10例のホモ接合体は高コレステロール血症 ( $271 \pm 32$  mg/dl, 平均  $\pm$  SD) を示し, HDL コレステロール ( $164 \pm 39$ ) とアポ蛋白 A-I ( $213 \pm 47$ ) の著明高値, および低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) コレステロール ( $77 \pm 31$ ) とアポ蛋白 B ( $54 \pm 14$ ) の低値を示した。総てのホモ接合体は HDL<sub>1</sub> (粒子径 > 12nm) に相当する巨大な HDL 粒子を有し, 健常者では認められない大粒子 IDL<sub>2</sub>, LDL<sub>1</sub> が増加しており, 通常認められる LDL<sub>2</sub> や LDL<sub>3</sub> が減少して代わりに LDL<sub>4</sub> の小粒子 LDL が増加し全体として LDL 亜分画がそれぞれ認められるという多様性を示した。20例のヘテロ接合体の血漿 CETP ( $1.4 \pm 0.3$  mg/l) は正常血漿 CETP 値 ( $2.3 \pm 0.6$ ) の約半量であり, 軽度の HDL コレステロール ( $66 \pm 15$ ), アポ蛋白 A-I ( $149 \pm 43$ ) の増加を示し, 特徴的に HDL<sub>2</sub>/HDL<sub>3</sub> 比の増加を認めた ( $1.5 \pm 0.8$  v.s.  $0.6 \pm 0.4$ )。また, CETP 欠損家系において早発性動脈硬化症は認められなかった。このように CETP 欠損はわが国の家族性高 HDL コレステロール血症の主因であることが示唆された。CETP 欠損のリポ蛋白組成は抗動脈硬化性であり長寿と関連している可能性が示唆された。

---

**Key words** cholesteryl ester transfer protein, familial hyperalphalipoproteinemia, haplotype analysis, high density lipoprotein, longevity

---

Abbreviations: apo A-I, apolipoprotein A-I; apo B, apolipoprotein B; BSA, bovine serum albumin; C, cholesterol; cDNA, complementary DNA; CE, cholesteryl ester; CETP, cholesteryl ester transfer protein; dCTP, deoxycytidine triphosphate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FC, free cholesterol; HTGL, hepatic lipase; HDL, high density

高比重リポ蛋白 (high density lipoproteins, HDL) はリン脂質 (phospholipid, PL), 遊離コレステロール (free cholesterol, FC) をリポ蛋白表面に, トリグリセライド (triglyceride, TG), コレステリルエステル (cholesteryl ester, CE) をリポ蛋白の核に含有し, アポ蛋白 A-I, A-II を構造蛋白としてもつ最も小さい粒子サイズのリポ蛋白である。血清比重では 1.063-1.21 g/ml に存在し, 比重により HDL<sub>2</sub> (比重 1.063-1.125) と HDL<sub>3</sub> (比重 1.125-1.21) に分けられる。

HDL は末梢細胞由来の FC, PL を肝に戻す作用と外因性 (食事性) および内因性の TG の多いリポ蛋白の加水により生じた余分な FC, PL を受けとり肝に戻す作用を有している。その過程は以下の 3 つに分けられる。1) 末梢細胞の細胞膜より受動的なコレステロールの濃度勾配により FC を取り込む。または, キロミクロン (chylomicron) や超低比重リポ蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) の加水により生じた FC を取り込む。2) レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (lecithin-cholesterol acyltransferase, LCAT) の活性により FC のエステル化を行う。3) 生成された HDL-CE を次の 3 経路を介して肝へ転送する。すなわち, i) アポ E をリガンドとして肝レセプターを介して肝に戻る経路, ii) コレステリルエステル転送蛋白 (cholesteryl ester transfer protein, CETP) の作用によりアポ B 含有リポ蛋白の経路に CE が転送され, レムナントレセプターや低比重 (low density lipoprotein, LDL) レセプターを介して肝に戻る経路, また, iii) HDL 粒子の細胞内への取り込み (endocytosis) を伴わない CE だけの選択的な肝への取り込みの経路の存在が示唆されている<sup>1)</sup>。しかし, それぞれの経路の重要度の割合に関しては解明されていない。

低 HDL-コレステロール (HDL-C) 血症は冠動脈硬化症の進展をもたらす, 反対に, 高 HDL-C 血症は動脈硬化性疾患が少なく, むしろ長寿 (longevity) と関連しているとされている<sup>2)</sup>。HDL-C 値は, 肥満 (特に内臓型肥満), 喫煙, 男性, 高多価不飽和脂肪酸食で低下することが知られているが<sup>3)</sup>, その成因に関しては不詳のことが多い。HDL 代謝に関連する蛋白は 20 種類以上同定されているが, その大部分の蛋白の機能について未だ十分に解明されていない。現時点で HDL の代謝は, 大きく分けて次の 3 つの要因により規定されてい

ると考えられる。一つは, その構造蛋白であるアポ A-I, A-II の合成, 分泌量であり, 次に, FC をエステル化する LCAT, キロミクロンや VLDL の加水を司るリポ蛋白リパーゼ (lipoprotein lipase, LPL) 活性, HDL の TG を加水する肝性リパーゼ (hepatic lipase, HTGL) 活性などの各種酵素活性の変動やその酵素活性の補因子 (cofactor) として作用する各種アポ蛋白の血清濃度の変動であり, もうひとつは HDL の構成脂質を他のリポ蛋白へ転送, 交換する脂質転送蛋白の血清濃度であると考えられる<sup>4)</sup>。従って, HDL の量的変動は, これらの多くの要素のなかで, HDL のアポ蛋白や構成脂質の代謝速度を規定する因子の異常と考えられる。

脂質転送蛋白には, 非極性脂質 (neutral lipid, つまり CE と TG) と PL の一部を転送するコレステリルエステル転送蛋白 (cholesteryl ester transfer protein, CETP) とリン脂質のみを転送するリン脂質転送蛋白 (phospholipid transfer protein, PLTP) が存在する<sup>5)</sup>。CETP は, 分子量 74,000 の疎水性糖蛋白であり<sup>6)</sup>, HDL で合成された CE を他のリポ蛋白へ転送し, 反対に TG の多いリポ蛋白 (VLDL-intermediate density lipoprotein, IDL) から TG を HDL に転送する役割を有している<sup>5)</sup>。

先に, Koizumi ら<sup>7)</sup>は, CE の転送活性の欠損に基づく家族性高 HDL-C 血症を報告した。本研究では, 高 HDL-C 血症の患者を対象に CETP のモノクローナル抗体を用い検討しさらにその遺伝子を解析し, CETP 欠損症のホモ接合体およびヘテロ接合体のリポ蛋白組成を検討した。

## 対象および方法

### I. 対 象

高 HDL-C 血症 (HDL-C > 100mg/dl) を少なくとも 1 名認める原発性高 HDL-C 血症の 21 家系を対象とした。先に報告された SY 家系<sup>7)</sup>, YoT 家系<sup>8)</sup>, YoS 家系<sup>9)</sup>のほか, 今回新たに見いだされた 18 家系を検討した。第一家系は, Koizumi ら<sup>7)</sup>が報告した石川県小松市出身の家系であり, CETP 活性の著明低値を示した。発端者の両親間にいとこ結婚を認めた。家系内に 97 歳と 87 歳の長寿例を認め, 心血管障害例を認めなかった。第二家系は, Saito<sup>10)</sup>が報告した岩手県出身の家系であり, 臨床的特徴として家系内に長寿例を多数認め

lipoprotein; IDL, intermediate density lipoprotein; kb, kilobase pairs; LCAT, lecithincholesterol acyltransferase; LPL, lipoprotein lipase; LPDS, lipoprotein deficient serum; LDL, low density lipoprotein; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate-buffered

た. 第三家系は, Takegoshi ら<sup>9)</sup>が報告した福井県出身の家系であり, 発端者の CETP 活性は, 正常の約10の1であった. 他は, 広島の家系, 東京の家系のほか, 石川・福井の18家系である.

II. 方法

1. 血清脂質, アポ蛋白の測定

14時間の絶食後の早朝空腹時に採血し血漿と血清を得た. C, TG は, 酵素法で測定した<sup>10)11)</sup>. アポ蛋白 (A-I, A-II, B, C-II, C-III, E) は免疫比濁法 (immunoturbidimetry, TIA)<sup>12)</sup>で測定した. HDL-C は, 沈殿法<sup>13)</sup>で測定した. HDL<sub>2</sub>/HDL<sub>3</sub>比は, 血漿 30 μl を sudan black B で染色したのち 4-30%の未変性ポリアクリルアミドゲル (PAA 4/30, Pharmacia, UPSALA, Sweden) で泳動し<sup>14)</sup>, 10nm の粒子サイズで HDL<sub>2</sub>と HDL<sub>3</sub>を分け密度計測した.

2. 血漿コレステリルエステル転送蛋白の測定

ヒト CETP の C 末端25アミノ酸を認識するモノクローナル抗体 TP2 と CETP の第261-367アミノ酸を認識する TP6 を用いた. <sup>125</sup>I で標識した TP2 を用いてラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA) 固相法で血漿 CETP 量を測定した<sup>15)16)</sup>. 血漿は, -70°C で凍結保存し, 同量の 2% Triton 飽和緩衝液 (3% Triton X-100, 1% bovine serum albumin (BSA), 0.02% NaN<sub>3</sub>, 1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む phosphate-buffered saline (PBS),

pH7.2) で37°C 1時間インキュベートし使用した. 15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH9.6 の緩衝液下で30ng の精製した CETP<sup>9)</sup>をプラスチックプレートに20°C, 18時間コーティングし, 300 μl の 1% BSA, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 1mM EDTA を含む PBS, pH7.2 で60分飽和させた. <sup>125</sup>I-TP2 (100,000 cpm, 9nCi/ng IgG) 抗体と抗原は, 1% Triton 飽和緩衝液で希釈し, 最終条件を0.5% Triton とした. 20°C, 90分間, 競合性免疫反応を行った.

CETP の比活性は, リポ蛋白除去血清 (比重>1.21 g/ml) で測定した. CETP 活性は, <sup>3</sup>H-cholesteryl oleate で標識した HDL<sub>3</sub>から LDL へのコレステリルエステルの転送 (Δcpm) により測定した<sup>17)</sup>. RIA 法で測定した CETP 量 (μg) で CETP 活性を除いて比活性を算出した<sup>18)</sup>.

ウェスタンプロット法による CETP の検出のために, 試料を Laemmli の方法<sup>19)</sup>によって SDS-ポリアクリルアミド電気泳動した. 蛋白質を 0.45 μM のニトロセルロース膜に転写した後, <sup>125</sup>I で標識した TP2 および TP6 (2×10<sup>5</sup> dpm/ml) に反応させた<sup>20)</sup>.

リン脂質転送活性は <sup>3</sup>H-dioleoylphosphatidylcholine で標識した HDL<sub>3</sub>から LDL への転送能を測定することによった<sup>17)20)</sup>. なおすべての転送活性は15%転送以内の直線反応域で行い, 3回で測定した.

抗 CETP モノクローナル抗体吸着カラムは,

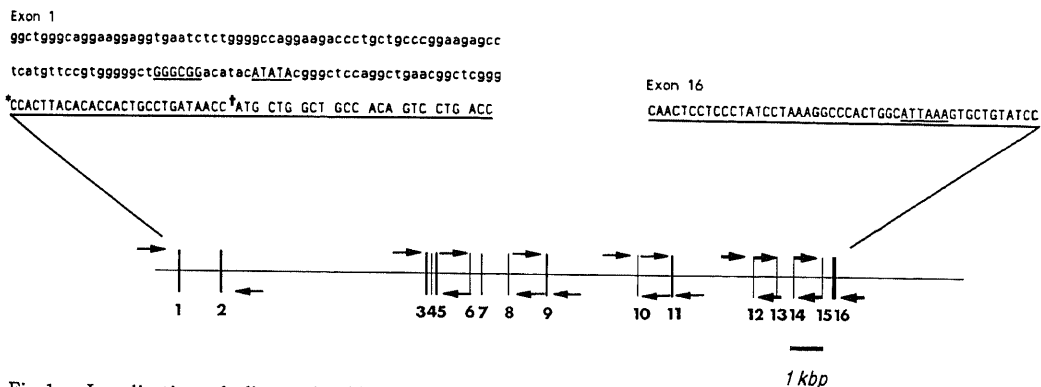


Fig. 1. Localization of oligonucleotide primers for polymerase chain reaction and the sequences of 5' and 3' flanking region of the human CETP gene. The human CETP gene spans 25 kbp. Perpendicular lines in the diagram represent 16 exons. Sequences in the upstream region resembling an SP1 binding site and a TATA box are shown underlined. A transcription initiation site (\*) is located at-27 nucleotide upstream of a translation initiation site (+ATG). A variant polyadenylation signal is shown at the distal end of exon 16.

saline; PCR, polymerase chain reaction; PL, phospholipid; RIA, radioimmunoassay; SDS, sodium dodecyl sulfate; TG, triglyceride; Tris, Tris (hydroxymethyl) aminomethane; VLDL, very low density lipoprotein

Cyanogen bromide で活性化した Sepharose 4B (Pharmacia) に IgG を結合させ作成した<sup>20)</sup>.

### 3. DNA 解析

1) ポリメラーゼ連鎖反応法 (polymerase chain reaction, PCR) とシーケンス法

高分子 DNA は, Triton X-100 融解変法<sup>21)</sup>により, EDTA-Na<sub>2</sub>中に採血した 10ml の末梢血から抽出した. Agellon ら<sup>22)</sup>が報告した正常 CETP 遺伝子のイントロン配列から計 9 セットのプライマーを作成し, PCR 法で DNA を増幅し, それぞれの DNA 断片をサブクローニングした (図 1). すべてのエクソン配列およびスプライシング部位を解読するため, すべてのプライマーをスプライス部位から 50-100 塩基上流または下流に設定した. さらに, ポリ A 部位および転写開始部位を含めた 5' 非翻訳領域を合わせ検討した. 転写開始点は開始コドンより 27 塩基上流にあり, 開始コドンより 60 塩基上流に位置するプライマー (5'-TAC-ATATACGGGCTCCAGGC-3') を用いて, 5' 非翻訳領域の配列を得た. 高分子 DNA 1  $\mu$ g を鋳型 DNA として 50 pmol のプライマー 1 組と 200  $\mu$ M の各 dideoxynucleotide (dGTP, dATP, dCTP, TTP) と 2.5 units の Taq polymerase (Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, USA) を 10mM Tris-HCl, pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin の緩衝液に加えた<sup>23)</sup>. 使用した PCR の条件は, 94°C30秒, 55°C1分, 74°C3分で 30 サイクル, 100  $\mu$ l のミネラルオイル (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) 下で増幅した (Microcycler, Eppendorf, Hamburg, Germany). 増幅した DNA 断片は, クロロホルムで 2 回抽出後, 10mM ATP 存在下で T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (New England Biolabs, Beverly, USA) を用いて 5' 末端をリン酸化し, 90°C で加熱したのち, 1% 低融点アガロースゲルに泳動後, 目的とする DNA 断片を切りだし, サブクローニングに用いた. リゲーションは, Sma I 切断し脱リン酸化した pGEM-3Zf (+) (Promega Biotek, Madison, USA) 30ng に目的の DNA 断片 300-400ng を加え, T4 DNA リガーゼ (New England Biolabs, Beverly, USA) を用いて, 10 mM ATP 存在下で, 15°C12時間反応させた. 大腸菌は, Hanahan 法<sup>24)</sup>でコンピテント化した DH5 $\alpha$  F'IQ (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, USA) を使用した. Taq ポリメラーゼ (Promega Biotek) を用いて dideoxynucleotide 法でシーケンスを行った. シーケンスゲルは, 7M 尿素, 6% のポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド/ビス, 19:1, Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) を使用し

た.

### 2) 直接塩基配列決定

イントロン 14 の G $\rightarrow$ A 変異の家系内診断および他の高 HDL-C 血症 20 家系の診断にダイレクトシーケンス法を用いた. イントロン 12 の P1 (5'-CCTGAGC-TATGAGACAAAAG-3') と イントロン 14 の P2 (5'-AAAAGGTGAAATGGGAAGCT-3') で PCR を行い, 約 780bp の単一 DNA 断片をえた. この DNA 断片をクロロホルムで抽出後 2ml の滅菌再蒸留水を加え, Centricon-30 (Amicon, Denvers, USA) で余分なプライマーおよびヌクレオチドを除去した. <sup>32</sup>P- $\gamma$ ATP (Amersham, Buckinghamshire, UK) で 5' 末端標識したエクソン 14 の P3 (5'-CCAGAGCTTC-TGCAGTCAA-3') を用いて, Higuchi らの方法<sup>25)</sup>で T7 DNA ポリメラーゼ (Sequenase, United States Biochemical Corporation (USB), Cleveland, USA) を用いてダイレクトシーケンシングを行った.

### 3) CETP 遺伝子のハプロタイプ解析

高分子 DNA 10  $\mu$ g を Taq I, Stu I でそれぞれ切断し, 0.7% のアガロースゲルで泳動した. ナイロンメンブレン (Hybond N, Amersham) に転写した後, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (Amersham) を用いて, random priming 法<sup>26)</sup>で標識した CETP complementary DNA (cDNA) (Genentech Inc., Dr. D. Drayna より供与) を用いて, サザンブロット<sup>27)</sup>を行った. Taq I 多型性は, full length cDNA (1581bp) を用い<sup>28)</sup>, Stu I 多型性には Pst I-PvuII 732bp の cDNA 断片を用いた<sup>29)</sup>. また, エクソン 9-イントロン 9 の境界より 29 塩基 3' 側に存在する BamH I 多型性は, PCR 法を用いて検出した<sup>30)</sup>. イントロン 8 の P4 (5'-TTGTTGAAT-GAGTGAAAGCC-3') と イントロン 9 の P5 (5'-CAC-CAAGTTTCCGAGTTTCC-3') でエクソン 9 を含む 460bp の DNA 断片を増幅し, BamH I で消化後, 2.0% のアガロースゲルで泳動しその DNA 断片の長さ (390 または 460bp) によって制限酵素切断部位の有無を決定した. 合計 4 つの制限酵素切断多型性を用いて CETP 遺伝子のハプロタイプを決定した.

### 4. 統計処理

$\chi^2$  検定 (Fisher's exact test) にてハプロタイプ群の観察度数の確率を検討した. 血清脂質・アポ蛋白の 8 つの変数に関して分散分析 (one way analysis of variance, ANOVA) を行い 4 群間の有意差比較を行った.

## 成 績

### 1. CETP 欠損症の生化学的検討

Koizumi らが報告した CETP 活性の著明低値が原

因と考えられる家族性高 HDL-C 血症 (SY) 家系を対象に RIA 法で血漿 CETP 値を測定した。ヒト CETP の C 末端 25 アミノ酸を認識するモノクローナル抗体 TP2 を用いた RIA 法および免疫吸着カラムで検討した結果、発端者 (SY) およびその妹 (KH) の血漿 CETP の欠損が確認された (図 2)。さらに、ヒト CETP の第 261-367 のアミノ酸を認識する TP6 モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットにおいても血漿 CETP は検出されなかった。発端者の 4 人の子供では、妻 (TY) およびコントロールの約半量 (1.0-1.4mg/l) の CETP 量を示した (表 1)。CETP の欠損を示した発端者のリン脂質 (PL) 転送活性はコント

ロールの約半量であった (表 1)。このことから、血漿中のリン脂質転送活性の約半分は CETP に依存し、残り半分は他の PL 転送蛋白または自動的な PL 転送能によることが示唆された。

II. CETP 欠損症における CETP 遺伝子の検討

CETP の欠損が CETP の構造遺伝子異常によるかどうかを調べるため、発端者 (SY) の高分子 DNA を用いてポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) 法を行い、全エクソン、スプライシング部位、転写開始点を含めた 5' 非翻訳領域、ポリ A 部位を含めた 3' 非翻訳領域の塩基配列を決定した (図 1)。PCR 中での合成反応の誤りを除外するために、複数の PCR 反応に由来した

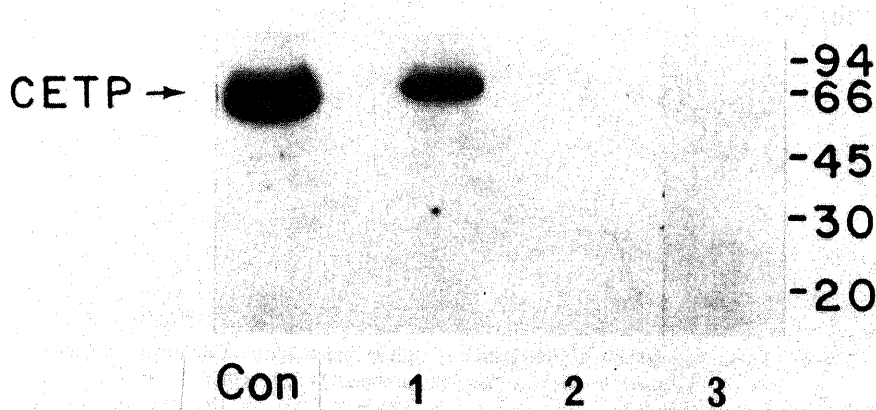


Fig. 2. Western blot of the immunoaffinity-column-retained fraction of plasma. 100  $\mu$ l plasma samples containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) were subjected to the TP2-immunoaffinity column. The retained fraction were subjected to SDS-PAGE and blotted with <sup>125</sup>I-TP2. SY and KH show no detectable CETP bands (column 2 and 3, respectively). YoS (column 1) shows about one-third of CETP mass compared to the control (Con.). The position of the 74 kD CETP is indicated.

Table 1. HDL-cholesterol, apolipoprotein A-I, HDL<sub>2</sub>/HDL<sub>3</sub> ratio, CETP activity and mass, and phospholipid transfer protein activity in the plasma of a CETP deficient family

	Age/Sex (yr/M, F)	HDL-C (mg/dl)	apo A-I (mg/dl)	HDL <sub>2</sub> / HDL <sub>3</sub>	CETP activity (%)	CETP mass (mg/l)	PLTP activity (%)
Proband	S. Y. 64/M	248	239	7.3	0	0	47±2
Sibling	K. H. 60/F	175	147	4.8	0	0	—
	H. H. 56/F	162	216	4.4	0	0	—
Spouse	T. Y. 58/F	64	—	1.0	110±10	2.5±0.6	—
Child	N. D. 35/F	52	98	1.5	60±12	1.0±0.2	—
	K. C. 33/F	65	132	1.5	62±5	1.3±0.3	—
	Y. Y. 31/F	77	132	2.7	80±14	1.4±0.3	91±4
	K. Y. 28/M	52	98	1.3	45±16	1.2±0.4	—
Controls (n=10)		45±10	117±20	0.6±0.4	—	2.2±0.6	—

mean±S.D.

DNA 断片から複数個のサブクローンを得て塩基配列を検討した結果、イントロン14のスプライドナー部位 (+1) に G→A の点変異を発見し、ダイレクトシーケンス法でその点変異の存在を確認した (図3)。これは、スプライドナー部位のコンセンサス配列である GT から AT への変異であり、正常スプライシングが障害されていることが判明した。 CETP が約半量であった発端者の4人の子供は、ダイレクトシーケ

ンス法でイントロン+1部位にGとAの両方のバンドを有し、同変異のヘテロ接合体であることが判明した (図3)。本家系では発端者を含めた8例の同胞中に、3例と高率にホモ接合体を認めた (図4)。

III. イントロン14のスプライシング異常の頻度とその表現型に関する検討

家族性高 HDL-C 血症におけるイントロン14のスプライシングドナー部位異常による CETP 欠損症の頻

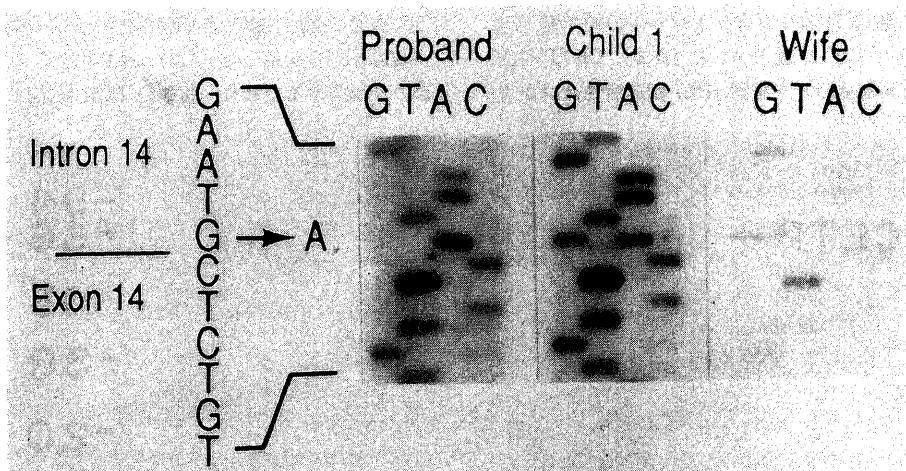


Fig. 3. Direct sequencing of the intron 14 splice donor site. The arrow indicates the G to A mutation in the homozygous proband (left). Child 1 (middle) is a heterozygote with both G and A at this position. Wife of the proband (right) shows the G residue, indicating a wild type.

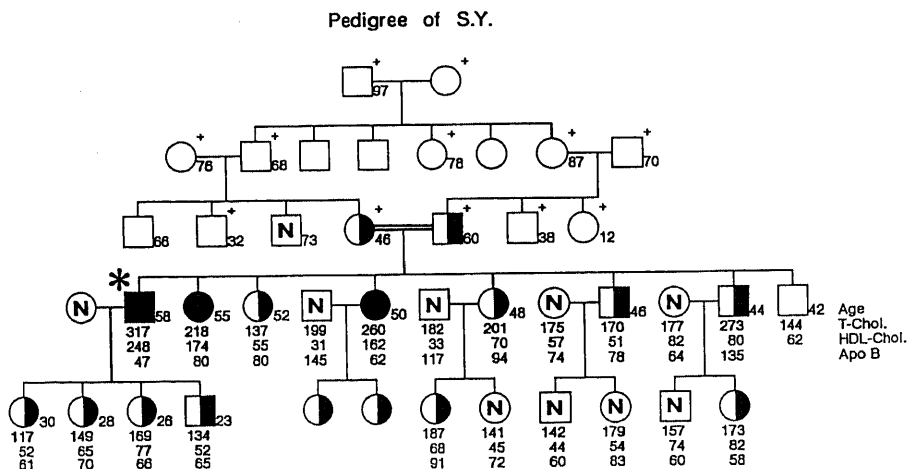


Fig. 4. Pedigree of the SY family. A first cousin marriage is observed between parents of S.Y. In tracing back three generations of the family, two persons are identified to have had long lives (87 and 97 years). A plus sign (+) denotes a deceased family member. N denotes a wild type of the intron 14 splice site. A asterisk sign (\*) denotes the homozygous proband in the family. Lipoprotein and apolipoprotein levels are mg/dl.

度を検討した。正脂血症33例の CETP 値の95%信頼区間は 1.9-2.3mg/l であった。血清 HDL-C 値が 100mg/dl 以上を示す血縁のない高 HDL コレステロール血症21家系の検討で15家系に血漿 CETP 値の低値 (<1.9mg/l) を認めた(表2)。さらに、この G→A 変異のホモ接合体を 5 家系、ヘテロ接合体を 4 家系と国内広範囲に同一の点変異を認めた(図5)。このことにより、CETP の低下は高 HDL-C 血症の成因の一つと考えられ遺伝的素因の果たす役割が大きいと考えられた。

ダイレクトシーケンシング法により家系内診断を行った5家系においてホモ接合体10例、ヘテロ接合体20例、正常16例を診断し CETP の血清リポ蛋白濃度に及ぼす影響を検討した(表3)。CETP を完全に欠損したホモ接合体は、TC 271±32 mg/dl, HDL-C 164±39 mg/dl, LDL-C 77±31 mg/dl, アポ A-I 213±47 mg/dl, アポ B 54±14 mg/dl と高 HDL-C 低

LDL-C 血症を認め、アポ A-I の増加とアポ B の低下を認めた。ヘテロ接合体では、CETP 1.4±0.3 mg/l と正常者の約半分の値を示し、TC 195±44 mg/dl, HDL-C 66±15 mg/dl, LDL-C 111±43 mg/dl, アポ A-I 149±43 mg/dl, アポ B 66±19 mg/dl と軽度高 HDL-C 血症を認め、特徴的に HDL<sub>2</sub>/HDL<sub>3</sub>比が約2倍に増加していた。HDL<sub>2</sub>の HDL 全体に対する比と血漿 CETP 値との間には、 $r = -0.790$  と有意な負の相関関係が認められた(図6)。これらの結果から、CETP 値が HDL<sub>2</sub> 値を決定する因子である事が示唆された。LDL-C 値は血漿 CETP 値に対して  $r = 0.517$  の正の相関を認め(図7)、LDL の成熟過程に LCAT 由来の CE が重要な役割を演じていることが示唆された。さらに、ホモ接合体例において黄色腫や冠動脈硬化性疾患を認めなかった(図2)。

CETP 欠損の null 表現型以外の高 HDL-C 血症例を対象にリポ蛋白除去血清分画 (lipoprotein deficient

Table 2. Lipid, lipoproteins, apolipoproteins and CETP levels in familial hyperalphalipoproteinemia

Case	Age/Sex (yr/M, F)	TC	TG	HDL -C	apo A-I	apo A-II	apo B	apo E	CETP	Disease	Origin
Homozygote of the G→A mutation											
1. SY	64 M	317	68	248	239	44	31	—	0	BA	Ishikawa
2. YoT	57 M	292	429	167	260	41	45	13.2	0	—	Iwate
3. HM	51 M	301	168	181	196	—	73	9.8	0	CVA, HT, GS	Hiroshima
4. YI	55 F	292	75	164	238	—	55	—	0	—	Hiroshima
5. MO	68 F	227	105	122	184	—	72	12.5	0	GS	Ishikawa
Heterozygote of the G→A mutation											
6. YoS	41 M	382	70	177	182	48	105	5.0	0.70	—	Fukui
7. TA	76 F	295	128	146	220	—	68	13.4	1.16	—	Tokyo
8. KiY	— F	222	77	106	201	—	75	4.2	2.02	—	Fukui
9. RT	58 F	248	40	138	—	—	—	—	1.05	—	Fukui
Normal for the G→A mutation											
10. MaM	60 M	212	54	115	201	—	69	—	1.61	MEN	Ishikawa
11. KoM	80 M	303	91	122	—	—	—	—	2.39	TB	Fukui
12. IM	49 M	262	71	104	195	—	82	4.7	2.28	—	Fukui
13. RN	63 M	294	228	102	—	—	—	—	2.31	DM, ASO	Ishikawa
14. KY	40 F	277	94	112	—	—	—	—	2.47	—	Fukui
15. TK	65 F	196	58	107	177	—	73	5.3	0.97	—	Ishikawa
16. YS	62 M	232	75	100	179	—	96	4.4	2.06	TB, DM	Ishikawa
17. AT	52 F	270	87	117	172	—	87	5.8	1.31	—	Fukui
18. TH	64 F	196	35	109	179	—	69	8.7	1.31	IHD	Toyama
19. ST	64 M	162	67	105	152	31	40	3.5	1.17	EMP, AH	Ishikawa
20. KK	77 M	243	66	110	208	—	67	5.7	1.49	HT	Ishikawa
21. YT	63 F	211	42	107	—	—	—	—	1.57	DM	Ishikawa

Lipid, lipoprotein, and apolipoprotein levels are mg/dl. CETP level is mg/l. Abbreviations used here are: BA, bronchial asthma; CVA, cerebral vascular attack; HT, hypertension; GS, gall stone; MEN, multiple endocrine neoplasia; TB, pulmonary tuberculosis; ASO, atherosclerosis obliterans; DM, diabetes mellitus; IHD, ischemic heart disease; EMP, emphysema; AH, alcoholic hepatitis.

serum, LPDS) における CETP の比活性を検討した. 比重  $d=1.21$  で48時間超遠心を行い LPDS に含まれる CETP の活性および蛋白量を別々に測定し, CETP 活性を蛋白量で除して比活性とした. 表2の症例 6(YoS), 症例 7(TA), 症例 10(MaM), 症例 12(IM) ではそれぞれ, 対照  $190 \pm 63 \text{cpm}/\mu\text{g}$  に対して 34, 27, 20,  $61 \text{cpm}/\mu\text{g}$  と CETP 比活性の低値を

示した. 超遠心法で得られた LPDS 分画には CETP や脂質転送抑制蛋白 (lipid transfer inhibitor protein) が含まれており, CETP 比活性の低値は異常 CETP の存在もしくは抑制蛋白の増加が考えられた. SDS-ポリアクリルアミドゲルの検討では, これらの症例の CETP のサイズは対照に比較して有意な変動を認めず, 少なくとも大きな一次構造や糖鎖の付加の異常は

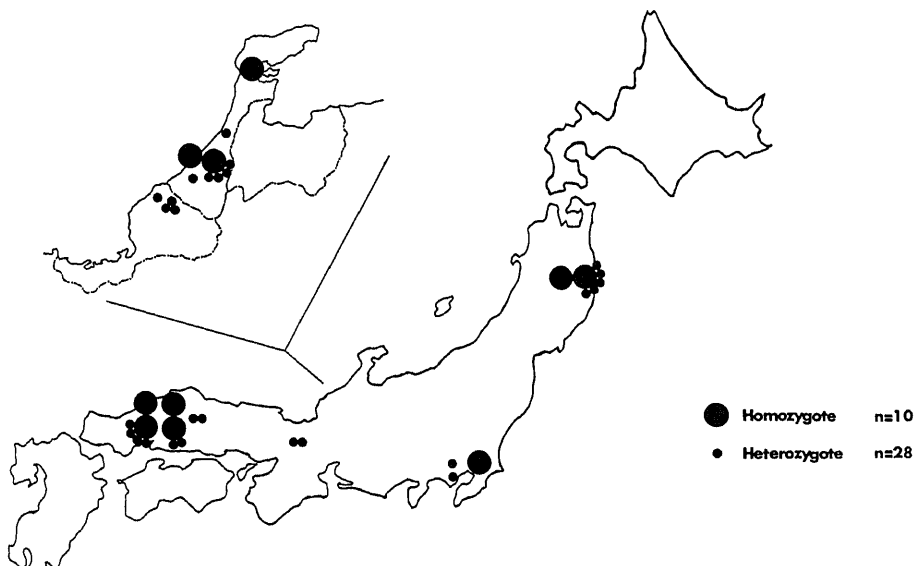


Fig. 5. Distribution of CETP deficiency caused by a splicing defect of intron 14 of the CETP gene. Among 21 hyperalphalipoproteinemic families, nine unrelated families were identified to have at least one mutant allele of the same mutation.

Table 3. The levels of lipid, apolipoprotein, and CETP in five families with CETP deficiency and normolipidemic controls

Group	Number (M/F)	Age (yr)	TC	TG	HDL-C	LDL-C	apoAI	apoB	CETP (mg/l)	HDL <sub>2</sub> /HDL <sub>3</sub>
			(mg/dl)							
Homozygote (10)	3/7	58±5	271±32	150±119	164±39	77±31	213±47	54±14	0±0	4.5±1.3
Heterozygote (20)	10/10	49±20	195±44	95±52	66±15	111±43	149±43	66±19	1.4±0.3	1.5±0.8
Unaffected (16)	5/11	48±22	189±38	107±81	53±14	117±35	124±21	78±35	2.3±0.6	0.7±0.4
Controls (10)	5/5	48±18	172±23	87±30	45±10	107±20	117±20	89±13	2.2±0.6	0.6±0.4
P values by ANOVA		0.58	<0.001	0.23	<0.001	0.05	<0.001	0.01	<0.001	<0.001
Homo vs. hetero		NS	<0.001	NS	<0.001	0.018	<0.001	NS	<0.001	<0.001
Homo vs. unaffected		NS	<0.001	NS	<0.001	0.009	<0.001	0.017	<0.001	<0.001
Hetero vs. unaffected		NS	NS	NS	0.075	NS	0.048	NS	<0.001	0.017
Hetero vs. control		NS	NS	NS	0.014	NS	0.025	0.023	<0.001	0.009

mean±S.D. NS: not significant.



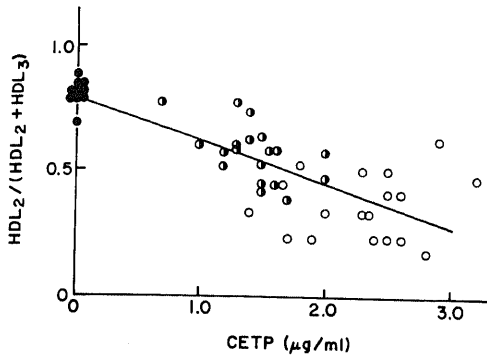


Fig. 6. Correlation between the CETP level and the ratio of HDL<sub>2</sub> to the sum of HDL<sub>2</sub> and HDL<sub>3</sub>. A negative correlation between the two variables was found for the three groups shown.  $y=0.79-0.17x$ , where  $y$  denotes the ratio  $[HDL_2/(HDL_2+HDL_3)]$ , and  $x$  denotes the CETP level.  $n=47$ ;  $r=-0.790$ ,  $p<0.001$ .

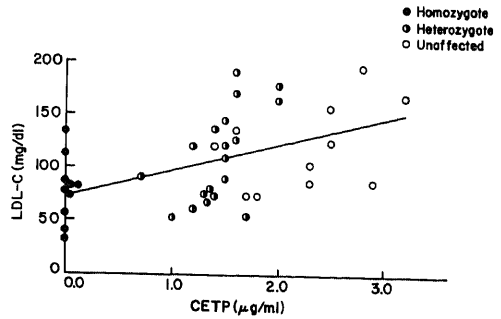


Fig. 7. Correlation between the CETP and the LDL cholesterol levels. A positive correlation between the two variables was found for all groups shown.  $y=72.8+24.8x$ , where  $y$  denotes LDL cholesterol and  $x$  denotes the CETP level.  $n=40$ ;  $r=0.517$ ,  $p<0.001$ .

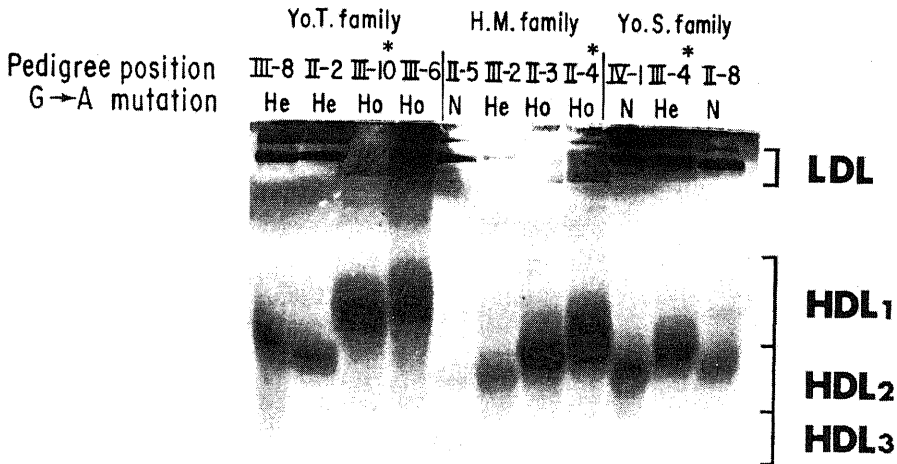


Fig. 8. The lipoprotein profiles of three CETP deficiency. Lipoproteins were separated on a native polyacrylamide gradient gel (4–30%) and stained with Sudan black. All homozygotes for the G to A mutation (the pedigree position III-10, III-6, II-3, and II-4) of Yo.T. and H.M. families shows markedly increased and enlarged HDL, corresponding to HDL<sub>1</sub> size ( $>12\text{nm}$ ). Heterozygotes (III-8, II-2, and III-2) in these families showed increased HDL<sub>2</sub> (particle size 10–12nm) to HDL<sub>3</sub> (8–10nm) ratio compared to the unaffected control (II-5 of the H.M. family). In the Yo.S. family, the proband (III-4), a heterozygote of the G to A mutation, exhibited an increased HDL<sub>1</sub> level, which was equal to that of the homozygotes of this mutation. Two individuals without this mutation, showed an increased HDL<sub>2</sub> level. Polydispersed but clearly distinct LDL subclasses (between LDL<sub>1</sub> and LDL<sub>4</sub>) were observed as a characteristic of the homozygous CETP deficiency. Ho denotes a homozygote of the G to A mutation, He its heterozygote, and N a wild type.

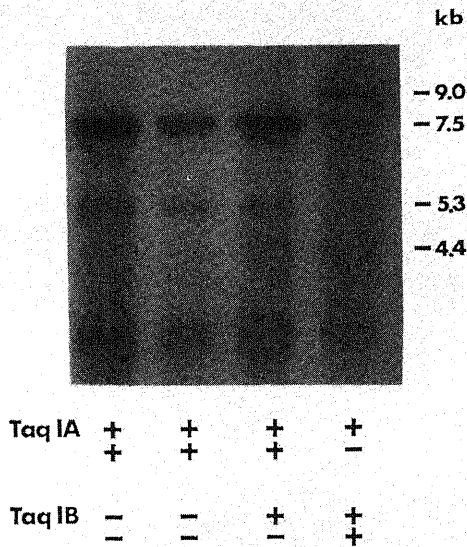


Fig. 9-1)

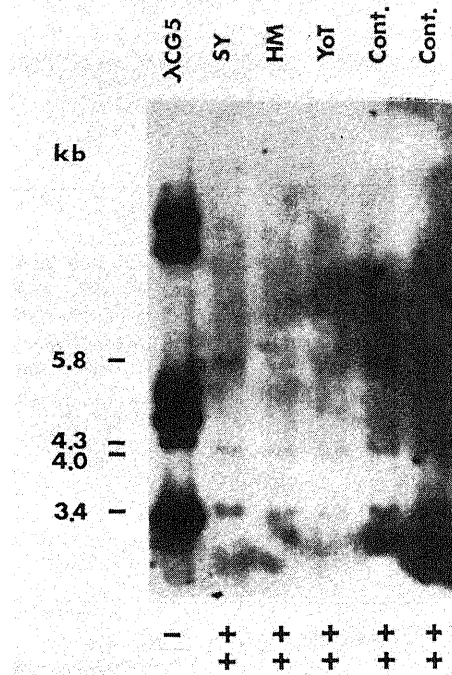


Fig. 9-2)

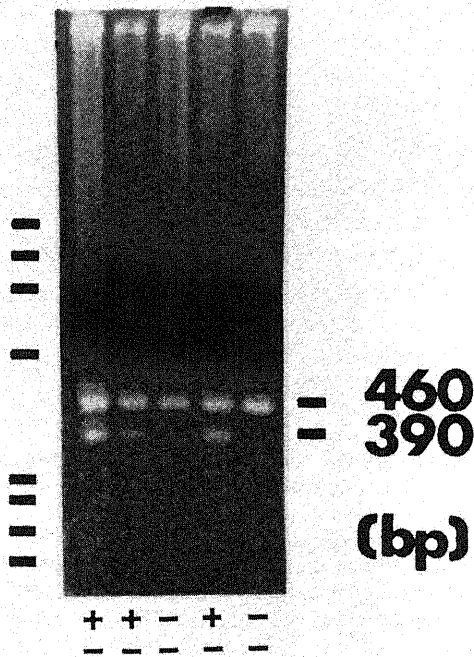


Fig. 9-3)

Fig. 9. 1) Taq I restriction fragment length polymorphism. After digestion of genomic DNA (10  $\mu$ g) with Taq I, Taq I A site (9.0 or 7.5 kb) and Taq I B site (5.3 or 4.4 kb) were analyzed by Southern hybridization (0.7% agarose gel), using full length CETP cDNA as the probe. A plus sign (+) denotes the presence of the restriction site, and a minus sign (-) its absence. 2) Stu I restriction fragment length polymorphism. After digestion of genomic DNA with Stu I, Stu I site (4.3 or 4.0 kb fragment) was analyzed by Southern hybridization (0.7% agarose gel) using Pst I-PvuII 732 bp cDNA as the probe.  $\lambda$  CG5 is a genomic clone encompassing the exons 6 to 14 of the human CETP gene. Two constant bands composed of 5.8 and 3.4 kb are shown. 3) BamH I restriction fragment length polymorphism of amplified DNA. The amplified DNA with the intron 8 primer and the intron 9 primer was digested with BamH I and separated by 2.0% agarose gel electrophoresis. The polymorphic site generated either 390 or 460 bp fragments, and located at 29 nucleotide downstream of the exon9/intron 9 boundary.

ないと考えられた。

IV. CETP 欠損症のリポ蛋白像

CETP 欠損に基づく高 HDL-C 低 LDL-C 血症のリポ蛋白像を未変性ポリアクリルアミドゲルで検討した(図8)。ホモ接合体2家系(YoT, HM)とヘテロ接合体1家系(YoS)の検討で、ホモ接合体(家系図位置III-10, III-6, II-3, II-4)では HDL<sub>1</sub>に相当する大粒子 HDL の増加が認められ、ヘテロ接合体(III-8, II-2, III-2)では正常(II-5)に対して HDL<sub>2</sub>分画の増加を認めた。ホモ接合体の LDL 分画では、通常認められない大粒子 LDL (IDL<sub>2</sub>と LDL<sub>1</sub>)と小粒子 LDL (LDL<sub>3</sub>)が増加し、反対に健常者で通常認められる LDL<sub>2</sub>や LDL<sub>3</sub>亜分画が減少し全体として LDL のそれぞれの亜分画が顕在化して幅広いバンドを呈した。また、低比活性 CETP を示しかつ G→A 変異のヘテロ接合体である YoS (III-4) は、CETP 欠損のホモ接合体の HDL<sub>1</sub>と量的に同程度の増加を認めたが、ホモ接合体で特徴的に認められた顕在化した LDL 亜分画の出現は認められなかった。

V. G-A 変異 CETP 欠損症の CETP 遺伝子ハプロタイプ

国内で広範囲に発見された G から A 変異に起因する CETP 欠損症の遺伝的背景を CETP 遺伝子のハプロタイプを決定することにより検討した。Taq I, Stu I, BamHI 3種類の制限酵素で得られた合計4つの制限酵素切断断片長多型性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)を用いて CETP 遺伝子の部分的なハプロタイプを決定した(図9)。日本人コントロールの CETP 遺伝子のハプロタイプは理論上の16型(2<sup>4</sup>)のうち4型のみが観察された。この内、IIおよび

IV型が高頻度であった。出身地の異なる血縁のないホモ接合体 G→A 変異の5例でハプロタイプを検討した結果、同一のハプロタイプを示した(表4)。χ<sup>2</sup>検定でII型ハプロタイプと G→A 変異間に連鎖不均衡を認めた(p<0.001)。

考 察

本研究では原発性高 HDL-C 血症の成因について CETP の生化学、分子生物学的検討を行った。先に報告された CETP 活性の著明低値を示した1家系の発端者の血漿中には2種のモノクローナル抗体で検出される CETP ポリペプチドは存在せず、null表現型であると考えられた。さらに、この欠損症は CETP 遺伝子のイントロン14のスプライス異常に起因することが判明した。このスプライス異常は検討した原発性高 HDL-C 血症21家系中9家系において少なくとも1接合子に同定され国内に広範囲に認められた。CETP 遺伝子のハプロタイプの検討でイントロン14の G→A 変異とハプロタイプIIとの間に連鎖の不均衡を認め、これらの CETP 欠損症例は共通の遺伝的背景を有する可能性が示唆された。同一遺伝子異常を基に CETP 欠損症のホモ接合体、ヘテロ接合体の診断を行った結果、CETP 欠損では高 HDL-C 低 LDL-C 低アポB血症であり臨床的に心血管系に動脈硬化を認めないことに加え、家系内に長寿例を認めることから CETP 欠損では抗動脈硬化性のリポ蛋白組成になると考えられた。

CETP 欠損のホモ接合体では非極性脂質の全転送能の欠損とリン脂質転送活性の約半量への低下が認められた。その結果、HDLに相当する大粒子 HDL の著

Table 4. Haplotypes of the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene in CETP deficiency and the Japanese controls

Haplotype	Location of polymorphic sites				Alleles studied	
	Taq IA Intron 2	BamHI Intron 9	TaqIB Intron 9	Stu I ND	CETP deficiency n=10	Controls n=30
I	+	+	+	+	-	2 (6.7%)
II	+	-	+	+	10	14 (46.7%)
III	-	-	+	+	-	9 (30.0%)
IV	-	-	-	+	-	5 (16.7%)

A plus sign denotes the presence of the restriction site, and a minus sign its absence. The location of the Stu I site was not determined (ND). Control alleles were those of controls from various regions of Japan, and CETP-gene alleles were those of five probands of the five families studied. Chi-square analysis showed a significant association between haplotype II and the G→A mutation genes (P=0.0068 for two-tailed analysis computed by Fisher's exact test).

増がみられ、CEの増加と共にアポEの増加があり<sup>7)</sup>、コレステロール負荷動物で認められるHDL<sub>1</sub><sup>30)</sup>と類似していた。ヘテロ接合体では軽度のHDL-Cの増加とHDL<sub>2</sub>分画の増加を認め、CETPの低下が高HDL<sub>2</sub>血症を規定する重要な要因であることが示唆された。非極性脂質転送能が欠損したラット<sup>9)</sup>ではリン脂質転送蛋白の活性がHDLの代謝速度を規定していることが示唆されており<sup>30)</sup>、ホモ接合体で認められる高HDL-C血症の変動(122-239mg/dl)は残存したリン脂質転送能の差異による可能性がある。

ヒト血漿の末梢細胞から肝へのコレステロール流入の経路は(1)コレステロールの末梢細胞からHDLへの取り込み、(2)HDL上のコレステロールのエステル化、(3)コレステリルエステルのアポB含有リポ蛋白への転送、または他の経路を介した肝への転送から成り立つ。このHDL-CEの代謝経路は未だ不詳のことが多いが、ウサギにおける検討で以下の3種の経路の存在とそれぞれの重要度が示唆されている<sup>1)</sup>。まず、i) CETPを介してHDL-CEをVLDL-IDL-LDL粒子へと転送する経路でありレムナントレセプターやLDLレセプターを介して肝へ取り込まれる。次に、ii) HDL粒子の肝細胞内への取り込みを伴わないCEだけの選択的取り込み(selective uptake)の経路であり、もう一つがiii) 巨大化したHDL粒子がリポ蛋白表面にアポEを取り込み、これをリガンドとしてレムナントレセプターやLDLレセプターを介して肝に取り込まれる経路である。他の動物種に比べ相対的に高CETP活性を有するウサギ<sup>31)</sup>では、これらの経路の重要度はそれぞれ70%、20%、10%であると報告されている<sup>1)</sup>。ヒトにおけるそれぞれの経路の重要度は不詳であるが、CETP欠損では約110mg/dlのHDL-CEの停滞がありヒトにおいても主要なHDL-CEの代謝経路はCETPを介した経路であると考えられる。本症においてアポE含有HDLの経路やCEの肝への直接的取り込みの経路は、HDL-CEの肝への逆転送路の変更路(alternative pathway)として相対的に亢進しているものと考えられる。事実、CETP欠損では正常では認められないHDL<sub>1</sub>に相当する大粒子HDLが増大しており、アガロースゲルカラムの検討でこれらの粒子はアポ蛋白Eを含有していることが示されている<sup>7)</sup>。しかしながら、アポE含有HDL粒子がLDLレセプターに結合するにはリポ蛋白表面に複数個のアポ蛋白Eをリガントとして必要とし<sup>30)</sup>、LDL粒子より強いレセプター親和度を有するアポE含有HDL粒子の実数は多くないものと予想される。従って、このアポEを介した実際のCEの代謝速度が遅いことが高HDL<sub>1</sub>

HDL<sub>2</sub>血症の成因と考えられる。さらに、HDL-Cのエステル化によりHDL<sub>3</sub>からHDL<sub>2</sub>へと粒子サイズが増大するが、CETP欠損症ではHDL<sub>1</sub>からHDL<sub>2</sub>の粒子の著増にも拘わらずその前駆体であるHDL<sub>3</sub>の増加が認められなかった。LCAT活性および血清のエステル化速度は正常範囲であったことより<sup>7)</sup>、HDL<sub>3</sub>の選択的な代謝経路の亢進または基質(遊離コレステロール)量の減少によるHDLコレステロールのエステル化の低下などが考えられる。

CETP欠損症のLDL-Cは約40mg/dlの低下と低アポB血症を伴っていた。この質的かつ量的な低LDL-C血症は以下の理由により動脈硬化惹起性が少ないと考えられる。i) LCAT活性により生成されたHDL-CEのアポB含有リポ蛋白への転送がCETPの欠損により阻止されるためLDLの高TG低CE化が認められる。ii) CETP欠損で認められるIDL<sub>2</sub>やLDL<sub>1</sub>などの大粒子LDLはLDL<sub>2</sub>やLDL<sub>3</sub>などの小粒子LDLに比べ肝への取り込みが速いことが予測され<sup>14)33)</sup>、これらの粒子の異化亢進が推定される。その結果、これらの大粒子LDLはCE含量の乏しいLDLであることによりLDLレセプター活性を増加させ低アポB血症をもたらしている可能性がある。また、iii) 試験管内でCETP活性をモノクローナル抗体で抑制した場合HDLからVLDLへのアポEの移動が亢進する<sup>30)</sup>ことが知られており、CETP欠損ではレムナントレセプターを介した異化が亢進している可能性も考えられる。

CETP欠損症では特徴的なLDL亜分画の顕在化が認められ、CETPがLCAT由来のCEをLDLへ転送することによりLDLの成熟過程を司る重要な因子であることが示唆される。試験管内でHDLとLDLに精製したCETPを添加しインキュベートするとCEとPLがHDLよりLDLへ転送されLDL粒子サイズの増大が認められる<sup>30)</sup>。CETP欠損症ではこのLDLの成熟過程が障害され、小粒子LDLが停滞しているものと考えられる。しかしながら、少なくとも3種類のLDL亜分画を有する症例では単一または二つのLDLを有する例に比べ動脈硬化性が少ないとする報告があり<sup>30)</sup>、これは、CETP欠損によるLDL未成熟とその低動脈硬化性と一致する結果である。LDLの多様性(未熟度)とその動脈硬化惹起性に関してはさらに検討を要すると思われる。

CETP遺伝子のイントロン14のGTからATへの点変異はスプライドナーの保存的配列の異常であり正常スプライシングは起こらずエクソン14もしくはその上流のいずれかのスプライドナー類似の配列

(cryptic splice donor site) で異常なスプライシングが生じている可能性がある。しかしながら、この点変異の上流と下流を認識する2つのモノクローナル抗体で認識されるポリペプチドが全く血漿中に検出されていない。仮に異常スプライシングで生じた CETP mRNA が細胞内で合成されたとしても、異常 mRNA の不安定性等により CETP mRNA の著減が生じていたり<sup>36)</sup>、顕著な3次構造の変化やN結合糖鎖の未付加などの翻訳後 (post-translation) の異常により分泌異常が生じている可能性が十分考えられる。最近、CETP は肝・小腸のほか脂肪組織や骨格筋でも発現していることが明らかとなり<sup>37)</sup>、CETP 欠損者の mRNA に対する直接的なアプローチが可能となっている。このスプライシング異常により生じる CETP mRNA の解析は CETP の構造、発現、機能の解明に寄与するものと考えられる。

さらに低比活性 CETP を有する高 HDL-C 血症の症例が散見されており、症例 6(YoS) および 7(TA) はイントロン14のスプライシング異常のヘテロ接合体であるにかかわらず表現型はホモ接合体に相当する高 HDL-C 血症を呈しており、もう一つなんらかの異常が重複し (他の CETP 遺伝子異常との複合ヘテロ接合体 (compound heterozygote) または、他の遺伝子異常の重複が考えられる)、低比活性 CETP を呈している可能性が示唆され、今後検討を要する課題である。

高頻度に同一の点変異が認められる場合、異なるハプロタイプ上に独立、反復して同一変異が出現する例と、これらの点変異が共通の遺伝的背景に起因する場合とがある。CETP 欠損症では後者と一致する結果であった。この G→A 変異は非コード鎖の CpG 配列における C から T への変異でありメチル化によって生ずる 5-methylcytosine から T への点変異の多発部位である可能性がある<sup>38)</sup>。この CpG 配列の変異と関係していると考えられる例で hemophilia A<sup>39)</sup>、adenosine deaminase 欠損<sup>40)</sup> のように異なるハプロタイプに同一変異が認められる (recurrent mutation) ものが報告されている。一方、phenylketonuria<sup>41)</sup>、familial defective apolipoprotein B<sup>42)</sup>、lipoprotein lipase 欠損症<sup>43)</sup> などでは特定の点変異と同一ハプロタイプとの連鎖の不均衡が報告されている。部分的ハプロタイプの検討では CETP 欠損は後者と一致した結果であり、この点変異が反復して生ずる変異であるという結果は今回の解析では得られなかった。わが国において CETP 欠損のような単一変異が高頻度で認められている疾患として phenylketonuria<sup>41)</sup>、adenine phosphoribosyl transferase 欠損<sup>44)</sup> が知られている。さらにわが国の phenylk-

etonuria は約10万出生に1例みられる高頻度な遺伝性疾患であり、北モンゴル人 (northern Mongoloid) を起源とした創始者効果 (founder effect) が想定されている<sup>45)</sup>。CETP 欠損においてもアジアの他民族における検討を含め、多数例での検討が今後必要と考えられる。

CETP 欠損症では臨床的に早発性動脈硬化を認めないが、HDL-CE の代謝速度は著明に低下している状態であり HDL<sub>1</sub>-HDL<sub>2</sub> の停滞が認められる。これらの粒子の末梢細胞からのコレステロール引出し作用は HDL<sub>2</sub> に比べ微弱であり、これらの粒子の増加に伴ういわゆるコレステロールの引出し作用の亢進は考えにくい。CETP 欠損により低アポ B・低 LDL-C 血症が生じていることからヒトでは LCAT 由来の CE が LDL の CE 含量の決定に強く関与していることが示唆され、さらに CETP が LDL の動脈硬化惹起性を規定している可能性が示唆された。

## 結 論

家族性高 HDL-C 血症の成因について血漿 CETP の生化学、分子生物学的検討を行い以下の結果を得た。

1. CETP 活性の著明低値を示した1家系の発端者の血漿中には2種のモノクローナル抗体で検出される CETP ポリペプチドは存在せず、null 表現型であると考えられた。

2. さらに、この欠損は CETP 遺伝子のイントロン14のスプライス異常に起因することが判明した。

3. このスプライス異常は検討した原発性高 HDL-C 血症21家系中9家系において少なくとも1接合子に同定され国内に広範囲かつ高頻度に認められた。

4. CETP 遺伝子のハプロタイプの検討でイントロン14の G→A 変異とハプロタイプ II との間に連鎖の不均衡を認め、これらの CETP 欠損症例は共通の遺伝的背景を有する可能性が示唆された。

5. 同一の遺伝子異常に基き CETP 欠損症のホモ接合体、ヘテロ接合体の診断を行い、それぞれのリポ蛋白像を検討した。ホモ接合体性 CETP 欠損では高 HDL-C 低 LDL-C 低アポ B 血症を認めた。ヘテロ接合体では HDL<sub>2</sub> の増加を特徴とし軽度の高 HDL-C 血症を認めた。これらの症例では心血管系に動脈硬化性疾患を認めず、家系内に長寿例を認めることから CETP 欠損は抗動脈硬化性のリポ蛋白像であると考えられた。

6. 以上より、家族性高 HDL-C 血症の成因として CETP 欠損症は重要な遺伝性疾患である。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導・御校閲を賜りました恩師竹田亮祐教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を直接御指導・御教示頂きました金沢大学医学部内科学第二講座の馬淵 宏助教授ならびに小泉順二講師に心から謝意を表します。また、米国学中、直接御指導頂きましたコロンビア大学内科分子医学科 Alan R. Tall 教授、同研究室の各位に感謝いたします。また、貴重な症例を御紹介頂いた丸浜喜亮教授(岩手医大第一内科)、八杉忠男教授(日本医大第二内科)、高田耕基先生(広島鉄道病院内科)、上田幸生先生(小松市民病院内科)、竹越忠美先生(福井県立病院内科)、安田紀久雄先生(安田内科病院)の他、内科学第二講座の皆様へ深謝致します。

本研究の一部は、第22回日本動脈硬化学会総会(平成2年6月7-8日)において発表した。

## 文 献

- 1) **Goldberg, D. I., Beltz, W. B. & Pittman, R. C.**: Evaluation of pathways for the cellular uptake of high density lipoprotein cholesterol esters in rabbits. *J. Clin. Invest.*, **87**, 331-346 (1991).
- 2) **Glueck, C. J., Fallat, R. W., Millett, F. & Steiner, P. M.**: Familial hyperalphalipoproteinemia. *Arch. Intern. Med.*, **135**, 1025-1028 (1975).
- 3) **Gordon, D. J. & Rifkind, B. M.**: High density lipoprotein-the clinical implications of recent studies. *N. Engl. J. Med.*, **321**, 1311-1316(1989).
- 4) **Tall, A. R.**: Plasma high density lipoproteins. metabolism and relationship to atherogenesis. *J. Clin. Invest.*, **86**, 379-384 (1990).
- 5) **Tall, A. R.**: Plasma lipid transfer proteins. *J. Lipid Res.*, **27**, 361-367 (1986).
- 6) **Hesler, C. B., Swenson, T. L. & Tall, A. R.**: Purification and characterization of a human plasma cholesteryl ester transfer proteins. *J. Biol. Chem.*, **262**, 2275-2282 (1987).
- 7) **Koizumi, J., Mabuchi, H., Yoshimura, A., Michishita, I., Takeda, M., Itoh, H., Sakai, Y., Sakai, K., Ueda, K. & Takeda, R.**: Deficiency of serum cholesteryl ester transfer activity in patients with familial hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis*, **58**, 175-186 (1985).
- 8) **Saito, F.**: A pedigree of homozygous familial hyperalphalipoproteinemia. *Metabolism*, **33**, 629-633 (1984).
- 9) **Takegoshi, Y., Haba, T., Kitoh, C., Tokuda, T. & Mabuchi, H.**: Decreased serum cholesteryl-ester transfer activity in a patient with familial hyperalphalipoproteinemia. *Clin. Chim. Acta*, **171**, 343-346 (1988).
- 10) **Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, S. G., Richmond, C. W. & Fu, P. C.**: Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, **20**, 470-475 (1974).
- 11) **Bucolo, G. & David, H.**: Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin. Chem.*, **19**, 476-482 (1973).
- 12) **Irish, G. R., Barrantes, D. M. & Ledue, T. B.**: Immunoturbidimetry of apolipoprotein B in human serum. *Clin. Chem.*, **33**, 1267 (1986).
- 13) **Bursterin, M. & Scholnich, H. R.**: Lipoprotein-polyanionmetal interactions. *Adv. Lipid Res.*, **11**, 67-108 (1973).
- 14) **Musliner, T. A. & Krauss, R. M.**: Lipoprotein subspecies and risk of coronary disease. *Clin. Chem.*, **34**, B78-83 (1988).
- 15) **Marcel, Y. L., McPherson, R., Hogue, M., Czarnecka, H., Zawadzki, Z., Weech, P. K., Whitlock, M. E., Tall, A. R. & Milne, R. W.**: Distribution and concentration of cholesteryl ester transfer protein in plasma of normolipemic subjects. *J. Clin. Invest.*, **85**, 10-17 (1990).
- 16) **Quinet, E. M., Agellon, L. B., Kroon, P. A., Marcel, Y. L., Lee, Y. C., Whitlock, M. E. & Tall, A. R.**: Atherogenic diet increases cholesteryl ester transfer protein messenger RNA levels in rabbit liver. *J. Clin. Invest.*, **85**, 357-363 (1990).
- 17) **Swenson, T. L., Brocia, R. W. & Tall, A. R.**: Plasma cholesteryl ester transfer protein has binding site for neutral lipids and phospholipids. *J. Biol. Chem.*, **263**, 5151-5157 (1988).
- 18) **Wang, S., Deng, L., Brown, M. L., Agellon, L. B. & Tall, A. R.**: Structure-function studies of human cholesteryl ester transfer protein by linker insertion scanning mutagenesis. *Biochemistry*, **30**, 3484-3490 (1991).
- 19) **Laemmli, U. K.**: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 20) **Hesler, C. B., Tall, A. R., Swenson, T. L., Weech, P. K., Marcel, Y. L. & Milne, R. W.**: Monoclonal antibodies to the Mr 74,000 cholesteryl ester transfer protein neutralized all of the cholesteryl ester and triglyceride transfer activities in human plasma. *J. Biol. Chem.*, **263**, 5020-5023

- (1988).
- 21) **Vandenplas, S., Wild, I., Rabie, A., Brebner, K., Ricketts, M., Wallis, G., Bester, A., Boyd, C. & Mathew, C.** : Blot hybridization analysis of genomic DNA. *J. Med. Genet.*, **21**, 164-172 (1984).
  - 22) **Agellon, L. B., Quinet, E. M., Gillette, T. G., Drayna, D. T., Brown, M. L. & Tall, A. R.** : Organization of the human cholesteryl ester transfer protein gene. *Biochemistry*, **29**, 1372-1376 (1990).
  - 23) **Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A.** : Analysis of enzymatically amplified  $\beta$ -globin and HLA-DQa DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, **324**, 163-166 (1986).
  - 24) **Hanahan, D. & Meselson, M.** : Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol.*, **100**, 333-342 (1983).
  - 25) **Higuchi, R., von Beroldingen, C. H. Sensabaugh, G. F., & Erlich, H. A.** : DNA typing from single hairs. *Nature*, **332**, 543-546 (1988).
  - 26) **Feiberg, A. P. & Vogelstein, B.** : A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13 (1983).
  - 27) **Southern, E.** : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
  - 28) **Drayna, D., Jarnagin, A. S., McLean, J., Henzel, W., Kohr, W., Fielding, C. & Lawn, R.** : Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA. *Nature*, **327**, 632-634 (1987).
  - 29) **Freeman, D., Sopher, J., Packard, C. J., Humphries, S. E. & Gaffney, D.** : An Stu I RFLP at the cholesteryl ester transfer protein (CETP) locus. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 2880 (1989).
  - 30) **Inazu, A., Brown, M. L., Hesler, C. B., Agellon, L. B., Koizumi, J., Takata, K., Maruham, Y., Mabuchi, H. & Tall, A. R.** : Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl ester transfer protein gene mutation. *N. Engl. J. Med.*, **323**, 1234-1238 (1990).
  - 31) **Pitas, R. E., Innerarity, T. L., Arnold, K. S. & Mahley, R. W.** : Rate and equilibrium constants for binding of apo E HDLc (a cholesterol-induced lipoprotein) and low density lipoproteins to human fibroblasts: evidence for multiple receptor binding of apo E HDLc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2311-2315 (1979).
  - 32) **Pownall, H. J., Hickson-Bick, D. & Massey, J. B.** : Effects of hydrophobicity on turnover of plasma high density lipoproteins labeled with phosphatidylcholine ethers in the rat. *J. Lipid Res.*, **32**, 793-800 (1991).
  - 33) **Witztum, J. L., Young, S. G., Elam, R. L., Carew, T. E. & Fisher, M.** : Cholestyramine-induced changes in low density lipoprotein composition and metabolism: I. Studies in the guinea pig. *J. Lipid Res.*, **26**, 92-103 (1985).
  - 34) **Bisgaier, C. L., Siebenkas, M. S., Hesler, C. B., Swenson, T. L., Blum, C. B., Marcel, Y. L., Milne, R. W., Glickman, R. M. & Tall, A. R.** : Effects of a neutralizing monoclonal antibody to cholesteryl ester transfer protein on the redistribution of apolipoprotein A-IV and E among human lipoproteins. *J. Lipid Res.*, **30**, 1025-1031 (1989).
  - 35) **Gambert, P., Bouzerand-Gambert, C., Athias, A., Farnier, M. & Lallemand, C.** : Human low density lipoprotein subfractions separated by gradient gel electrophoresis: composition, distribution, and alterations induced by cholesteryl ester transfer protein. *J. Lipid Res.*, **31**, 1199-1210 (1990).
  - 36) **Treisman, R., Proudfoot, N. J., Sharder, M. & Maniatis, T.** : A single base change at a splice site in a  $\beta^0$ -thalassemic gene causes abnormal RNA splicing. *Cell*, **29**, 903-911 (1982).
  - 37) **Jiang, X. C., Moulin, P., Quinet, E. M., Goldberg, I. J., Yacoub, L. K., Agellon, L. B., Compton, D., Schnitzer-Polokoff, R. & Tall, A. R.** : Mammalian adipose tissue and muscle are major sources of lipid transfer protein mRNA. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4631-4639 (1991).
  - 38) **Rideout III, W. M., Coetzee, G. A., Olumi, A. F. & Jones, P. A.** : 5-methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science*, **249**, 1288-1290 (1990).
  - 39) **Youssoufian, H., Antonarakis, S. E., Bell, W., Griffin, A. M. & Kazazian Jr., H. H.** : Nonsense and missense mutations in hemophilia A: estimate of the relative mutation rate at CpG dinucleotides. *Am. J. Hum. Genet.*, **42**, 718-725 (1988).
  - 40) **Markert, M. L., Norby-Slycord, C. & Ward,**

F. E. : A high proportion of DNA point mutations associated with a specific alanine-to-valine substitution. *Am. J. Hum. Genet.*, **45**, 354-361 (1989).

41) Wang, T., Okano, Y., Eisensmith, R. C., Harvey, M. L., Lo, W. H. Y., Huang, S-Z., Zeng, Y-T., Yuan, L-F., Furuyama, J., Oura, T., Sommer, S. S. & Woo, S. L. C. : Founder effect of a prevalent phenylketonuria mutation in the Oriental population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 2146-2150 (1991).

42) Ludwig, E. H. & McCarthy, B. J. : Haplotype analysis of the human apolipoprotein B mutation associated with familial defective apolipoprotein B 100. *Am. J. Hum. Genet.*, **47**, 712-720 (1990).

43) Monsalve, M. V., Henderson, H., Roederer, G., Julien, P., Deeb, S., Kastelein, J. J. P., Peritz, L., Devlin, R., Bruin, T., Murthy, M. R. V., Gagne, C., Davignon, P., Lupien, P. J., Brunzell, J. D. & Hayden, M. R. : A missense mutation at codon 188 of the human lipoprotein lipase gene is a frequent cause of lipoprotein lipase deficiency in persons of different ancestries. *J. Clin. Invest.*, **86**, 728-734 (1990).

44) Hidaka, Y., Tarle, S. A., Fujimori, S., Kamatani, N., Kelley, W. N. & Palella, T. D. : Human adenine phosphoribosyltransferase deficiency: demonstration of a single mutant allele common to the Japanese. *J. Clin. Invest.*, **81**, 945-950 (1988).

**Plasma Cholesteryl Ester Transfer Protein in Familial Hyperalphalipoproteinemia**  
Akihiro Inazu, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University,  
Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **100**, 1085—1101 (1991)

**Key words** cholesteryl ester transfer protein, familial hyperalphalipoproteinemia, haplotype analysis, high density lipoprotein, longevity

#### Abstract

The plasma high density lipoprotein (HDL) cholesterol is a protective factor in the development of atherosclerosis. Recently, a family with increased HDL cholesterol level was described to be deficient in cholesteryl ester transfer activity in plasma. Plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP), a hydrophobic glycoprotein with Mr. 74,000, catalyzes the transfer of cholesteryl esters from HDL to other lipoproteins. Using monoclonal antibodies against human CETP, CETP was not detected in two siblings with increased HDL cholesterol level. They are homozygous for a point mutation in the 5'-splice donor site of the intron 14 of the gene for CETP, which is incompatible with normal splicing of pre-messenger RNA. Furthermore, the same splicing defect was identified in 9 unrelated families (at least one allele) out of 21 families with an increased HDL cholesterol level (>100 mg/dl) who had originated from four different regions of Japan (Hokuriku, Iwate, Hiroshima, and Tokyo). Analysis of the restriction fragment length polymorphism of the CETP gene showed that all probands of 5 CETP deficient families, were homozygous for the identical haplotype, which suggests that they may share a common genetic background. Five family members with CETP deficiency were separated into three groups on the basis of the presence of the splicing defect (G→A mutation). Family members homozygous for CETP deficiency (n=10) had hypercholesterolemia ( $271 \pm 32$  mg/dl, mean  $\pm$  S.D.), markedly increased levels of HDL cholesterol ( $164 \pm 39$ ) and apolipoprotein A-I ( $213 \pm 47$ ), and decreased levels of the low density lipoprotein cholesterol ( $77 \pm 31$ ) and the apolipoprotein B ( $54 \pm 14$ ). All homozygotes showed enlarged HDL corresponding to HDL<sub>1</sub> size (particle size: >12 nm). They had polydispersed and finely distinct LDL subclasses (between IDL<sub>2</sub> and LDL<sub>4</sub>), in which large LDL such as IDL<sub>2</sub> and LDL<sub>1</sub> and small LDL such as LDL<sub>4</sub> were increased, and conversely LDL<sub>2</sub> and



LDL<sub>3</sub> were decreased. Members heterozygous for the deficiency (n=20), whose CETP levels ( $1.4 \pm 0.3$  mg/l) were in the lower part of the normal range ( $2.3 \pm 0.6$ ), had slightly increased levels of HDL cholesterol ( $66 \pm 15$ ) and apolipoprotein A-I ( $149 \pm 43$ ), and an increased ratio of HDL<sub>2</sub> to HDL<sub>3</sub> ( $1.5 \pm 0.8$  vs.  $0.6 \pm 0.4$ ). There was no evidence of premature atherosclerosis in the families with CETP deficiency. Thus, the CETP deficiency appears to be a major cause of familial hyperalphalipoproteinemia in Japan. The lipoprotein profile of subjects with CETP deficiency is potentially anti-atherogenic and may be associated with an increased life span.