

コレステリルエステル転送蛋白欠損症と動脈硬化に関する研究

著者	小泉 順二
著者別表示	Koizumi Junji
雑誌名	平成3(1991)年度 科学研究費補助金 一般研究(C) 研究成果報告書
巻	1990-1991
ページ	13p.
発行年	1992-03
URL	http://doi.org/10.24517/00049282



コレステリルエステル転送蛋白欠損症と 動脈硬化に関する研究

研究課題番号 02670278

平成3年度科学研究費補助金（一般研究C）
研究成果報告書

平成4年3月

研究代表者 小 泉 順 二
(金沢大学医学部附属病院講師)

K11711
1991
15
はしがき

研究組織

研究代表者：平成2, 3年度 小泉順二（金沢大学医学部附属病院・講師）

研究経費

平成2年度	900千円
平成3年度	1,200千円
計	2,100千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Koizumi J., Thompson GR.

Effects of infusing apoHDL/phosphatidylcholine complexes into normal and hypercholesterolemic rabbits.

50th Anniversary of phospholipid research (EPL). ed by Gundermann KJ, and Schumacher R, wbn-Verlag, Bingen/Rhein 149-159, 1990.

2. Koizumi J., Michishita I., Thompson GR.

Cholesterol-mobilizing capability of apolipoprotein A-1/phosphatidylcholine complexes.

Disorders of HDL. ed by LA Carlson, Smith-Gordon, London 225-232, 1990.

3. Inazu A., Brown ML., Hesler CB., Agellon LB., Koizumi J., Takata K., Maruhama Y., Mabuchi H., Tall AR.

Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation.

N Engl J Med 323: 1234-1238, 1990.

4. 小泉 順二, 馬淵 宏.

コレステリルエステル転送蛋白

Chronic Disease 4: 581-584, 1990.

5. 小泉 順二.

CETP 欠損症とコレステロール代謝

Therapeutic Research 11: 3301-3306, 1990.

6. 小泉 順二, 馬淵 宏.

コレステリルエステル転送蛋白 (CETP) 欠損症

治療学 24: 246-250, 1990.

7. Koizumi J., Inazu A., Yagi K., Koizumi I., Uno Y., Kajinami K., Miyamoto S., Moulin P., Tall AR., Mabuchi H., Takeda R.

Serum lipoprotein lipid concentration and composition in homozygous and heterozygous patients with cholesteryl ester transfer protein deficiency.

Atherosclerosis 90: 189-196, 1991.

8. 小泉 順二.



8000-15348-3

金沢大学附属図書館

HDL 代謝と冠動脈硬化.

循環器科 29: 353-360, 1991.

9. 稲津 明広, 小泉 順二, 馬淵 宏.

コレステリルエステル転送蛋白欠損症と高 HDL 血症の分子生物学.

医学のあゆみ 157: 811-816, 1991.

(2) 口 頭 発 表

1. 小泉 順二, 稲津 明広, 八木 邦公, 小泉 一郎, 宇野 欣秀, 梶波 康二, 藤田 一
馬淵 宏, 竹田 亮祐, A. Tall.

ヘテロ接合体性コレステリルエステル転送蛋白 (CETP) 欠損症の高比重リポ蛋白 (HDL) の脂質組成の異常

平成 2 年度日本動脈硬化学会 冬季大会 Dec. 13, 1990. (宮崎)

2. 小泉 順二, 宇野 欣秀, 小泉 一郎, 梶波 康二, 馬淵 宏, 竹田 亮祐
竹越 忠美, 若杉 隆伸, 藤田 一, 上田 幸生, 宮元 進, 大家他喜男.

HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (MK-733) とプロブコール投与によるアポE含有 HDL の減少.
第22回日本動脈硬化学会総会 Jun. 7, 1990. (甲府).

3. 小泉 順二, 稲津 明広, 八木 邦公, 小泉 一郎, 宇野 欣秀, 梶波 康二, 馬淵 宏
竹田 亮祐, A. Tall.

CETP 欠損症のヘテロ接合体における HDL の脂質組成の異常

第32回日本老医学会総会 Nov. 15, 1990. (高知)

4. 稲津 明広, 小泉 順二, 小泉 一郎, 宇野 欣秀, 藤田 一, 梶波 康二, 馬淵 宏
竹田 亮祐, 上田 幸生, M. L. Brown, A. Tall.

コレステリルエステル転送蛋白欠損の遺伝子異常

第22回日本動脈硬化学会総会 Jun. 7-8, 1990. (甲府)

5. 稲津 明広, 小泉 順二, 小泉 一郎, 宇野 欣秀, 藤田 一, 梶波 康二, 馬淵 宏
竹田 亮祐, 上田 幸生, A. Tall, 黒田 継久, 丸浜 喜亮, 高田 耕基, 平田 康彦,
梶山 梧郎.

Common CETP gene mutation の genetic background の検討

第22回日本動脈硬化学会総会 Jun. 7-8, 1990. (甲府)

6. 宇野 欣秀, 稲津 明広, 小泉 一郎, 藤田 一, 梶波 康二, 小泉 順二, 馬淵 宏
竹田 亮祐, 伊藤 英章, A. Tall.

Common CETP の遺伝子異常の dot blot hybridization によるスクリーニング法

第22回日本動脈硬化学会総会 Jun. 7, 1990. (甲府)

7. 稲津 明広, 小泉 順二, 馬淵 宏, 竹田 亮祐.

コレステリルエステル転送蛋白欠損症のリポ蛋白代謝.

第28回日本臨床代謝学会総会 Apr. 26, 1991. (岐阜)

8. 稲津 明広, 小泉 順二, 八木 邦公, 小泉 一郎, 宇野 欣秀, 梶波 康二, 馬淵 宏
竹田 亮祐, 藤田 一, 伊藤 英章, 上田 幸生, 宮元 進, 太田 正之, 竹越 忠美

コレステリルエステル転送蛋白による高 HDL 血症の分類.

第23回日本動脈硬化学会総会 Jun. 7, 1991. (神戸)

研究成果

I：研究目的

動脈硬化症の成因および進展に低比重リポ蛋白(LDL)などアポB含有リポ蛋白が重要である。同時に、高比重リポ蛋白(HDL)の重要性も疫学調査より認識されており、HDLコレステロールは冠動脈硬化症の負の危険因子とされている。しかし、HDLの代謝および調節機構には不明の点が多い。コレステリルエステル転送蛋白(CETP)は、高比重リポ蛋白(HDL)のコレステリルエステル(CE)をアポB含有リポ蛋白へ転送するHDL代謝に重要な蛋白である¹⁾。

我々は、コレステリルエステル転送活性(CETA)欠損患者では、高HDL-コレステロール(C)血症が認められ²⁾、この疾患はCETP遺伝子のイントロン14のスプライズドナーサイトのGよりAへの点変異によるCETP欠損症であることを報告した³⁾。CETP欠損症のホモ接合体では著しい高HDL-C血症を認め、血清リポ蛋白は抗動脈硬化的と考えられているが、ヘテロ接合体での異常は明かでない。CETP欠損症はわが国においてのみ発見されている疾患である⁴⁾。わが国における高HDL-C血症におけるCETP欠損症の占める重要性和動脈硬化症との関係は興味のあるところであるが、ヘテロ接合体の確定診断には遺伝子診断が不可欠である。今回、我々はヘテロ接合体を診断するためのCETP遺伝子異常のスクリーニング方法を開発し、その臨床像を明らかにした。

II：研究方法

(1)ヘテロ接合体のリポ蛋白代謝異常を検討するために、CETP欠損症の家系で早朝空腹時に採血し、血漿にて超遠心法によるリポ蛋白分析を行った。比重1.006kg/L以下(VLDL)、1.006-1.019kg/L(IDL)、1.019-1.063kg/L(LDL)、1.063kg/L以上(HDL)に分け、脂質組成の検討をおこなった。血球成分よりTriton X-100 lysis法でDNAを抽出し、イントロン14のスプライズド

ナーサイトの異常を明らかにするためにその部位をpolymerase chain reaction(PCR)で増幅し直接塩基配列決定法にてヘテロ接合体、ホモ接合体の診断を行った⁴⁾。血清CETP量の測定は抗CETPモノクローナル抗体(TP2)を用いたRIA法でコロンビア大学のA. Tall教授の協力で測定した⁵⁾。

(2)わが国におけるCETP欠損症がすべて同一起源の遺伝子変異によるかを検討するために、家系の異なる5例のホモ接合体でCETP遺伝子のハプロタイプの詳細な検討を行った。

(3)わが国におけるCETP欠損症の頻度を検討するために、血清HDL-Cが60mg/dl以上の血縁のない109例を対象に、イントロン14の点変異の有無を検討した。変異の検討のため、PCRを利用して新しい制限酵素切断部位を作成する簡便なスクリーニング方法を開発した。イントロン13の部位の14 I Aプライマーとイントロン14の14 I B47プライマーでPCRを行い、変異のある場合はNde I制限酵素の切断部位ができるように設計した。

14 I A : 5'-AGC ATC TGC CTT GTG GGT-3'

14 I B47: 5'-AAG CTC TGT CAG CCT CGG CAC CCA GTT TCC CCT CCA GCC
CAC ACA TA-3'

PCRで増幅されたDNAをNde Iで切断後、3.0%NuSieve 3:1 agarose gelで泳動した。

Ⅲ：結果

(1)CETP欠損症のリポ蛋白脂質の検討

CETP欠損症患者のリポ蛋白の脂質濃度測定の結果を表1に示した。ホモ接合体のHDL中の遊離コレステロール(UC)とコレステリルエステル(CE)は0.93mmol/Lと3.28mmol/Lでヘテロ接合体、対照群より有意に高値であった($p < 0.01$)。磷脂質(PL)もヘテロ接合体、対照群より高かったが、トリグリセライド(TG)は逆に低下していた。ヘテロ接合体のHDL-CEは1.48mmol/Lで家系内対照者および正常血清脂質の対照群の1.27mmol/Lと1.21mmol/Lより僅かに高いが、有意差は認められなかった。しかし、HDL-TGは対照群より低下していた($p < 0.05$)。VLDL分画では、ホモ接合体でUC、TGとPLの増加が

みられたが、CEの増加はみられなかった。IDL分画では、ホモ接合体でCEの低下が認められた($p < 0.05$)。

各リポ蛋白分画の脂質組成を検討した(表2)。ホモ接合体では、VLDLとIDLではEC/TG比の低下、HDLではEC/TG比の増加が認められた($p < 0.01$)。ヘテロ接合体では、IDLのEC/TG比が家系内対照者より有意に低下していた($p < 0.01$)。

血清CETP量と各リポ蛋白の脂質濃度および脂質組成比との相関関係を検討した(表3)。VLDL-UC, VLDL-TG, VLDL-PL, HDL-UC, HDL-CE, HDL-PLはCETPと有意の負の相関が($p < 0.05$)、IDL-CE, HDL-TGはCETPと有意の正の相関が得られた($p < 0.05$)。脂質組成比とでは、IDL-EC/TG比が $r = 0.843$ ($p < 0.001$)と正の相関が、HDL-EC/TG比が $r = -0.739$ ($p < 0.001$)と負の相関が認められた。以上の結果は、CETPがHDLとIDLなどのTG-richリポ蛋白との間のCEの転送に重要であることを示唆していると考えられる。

(2) CETP欠損症のハプロタイプの検討

このCETP欠損症はわが国でのみ発見されている代謝異常である。イントロン14のスプライシング異常によるCETP欠損症が同じ起源を持つ遺伝子変異かを検討するために、CETP遺伝子のハプロタイプを4種の多型性(Taq IA, Taq IB, BamHI, Stu I)で分類した。家系の異なる5例のホモ接合体のハプロタイプは同じであり、同一の起源による変異と考えられた(表4)。

(3) CETP欠損症のスクリーニング

イントロン14のスプライシング異常のCETP遺伝子を方法に述べたように、PCRで新しい制限酵素部位を作成し検討した。PCRで増幅生成したDNAの塩基配列を図1に、泳動のパターンを図2に示した。異常の見られたDNAの塩基配列を直接塩基配列決定法で検討したが、すべてGよりAの変異が確認された。ホモ接合体とヘテロ接合体の鑑別は直接塩基決定法を併用して行った。

血清HDL-C値が120mg/dl異常では、21例中8例がホモ接合体、6例がヘテロ接合体で、異常遺伝子の頻度は52%であった(表5)。HDL-Cが100-119mg/dlでの異常遺伝子頻度は8%、80-99mg/dlでは3%、60-79mg/dlでは1%であった。現在、我々は7家系13例のホモ接合体を確認している(図3)。

IV：考察

CETPはHDLとアポB含有リポ蛋白との間で、CEとTGを相互に交換し、また、CEのみを転送すると考えられている。CETPの活性が認められないラットなどは高コレステロール食にても動脈硬化は発生し難く、ウサギなどのCETP活性が高い動物では動脈硬化を起こしやすい食事でも容易に動脈硬化が生じる。これらのことよりCETPの低下は抗動脈硬化的に働くと考えられている。遺伝子異常が明らかになる以前は、ヘテロ接合体の診断ができず、CETPが正常の半量であるヘテロ接合体のリポ蛋白がどのような変化を示しているかは明かでなかった。今回、我々は遺伝子診断法を確立し、ヘテロおよびホモ接合体の診断を行った。

今回の検討では、ヘテロ接合体のHDLは量的には僅かのCEの増加を示すのみであったが、脂質組成では明らかなCETP量の低下の影響が認められた。さらに、注目すべきことはCETP量とIDLのECおよびEC/TG比との間に正の相関が認められたことである。以前、我々はLDL-CとCETPとの正の相関関係を示し、CETPの低下はLDL-Cの低下をもたらすことにより動脈硬化を発生し難くしている可能性を示唆した⁴⁾。今回、LDLと同様に動脈硬化を促進するIDL-Cの増加とCETPとの関係が示唆された。Bisgaier et al.はCETP欠損症患者でのVLDL, LDLのCEの脂肪酸分析より、in vivoでのCEの転送障害の存在を証明し、LDLの生成過程におけるHDLよりVLDL, IDLへのCEの転送の重要性を示唆した⁶⁾。従って、CETP欠損症ではCETPの量の程度により動脈硬化を促進するリポ蛋白が減少し、また、動脈硬化を予防するリポ蛋白が増加していると思われた。

上述のようにヘテロ接合体のリポ蛋白もホモ接合体と同様に抗動脈硬化的と考えられ、ヘテロ接合体を含めたCETP欠損症のスクリーニングの重要性が考えられる。すべての対象で塩基配列を決定するのは膨大な労力と時間が必要であり、また、ドットプロット法などでは条件により疑陽性、疑陰性を生じる可能性があり、我々はPCR法により新しい制限酵素切断部位を作成する方法を開発した。この方法では条件設定が他の方法より容易であり、アイソトープを使用せず短時間で結果が判定できるスクリーニングに適した方法と考えられる。

HDL-Cが60mg/dl以上の109例の遺伝子異常の有無の検討で、HDL-Cが120mg/dl以上での異常遺伝子発現頻度は52%であり、100mg/dl以上では28%であった。血清HDL-Cが120mg/dl以上の21例中14例にこの遺伝子異常が認められたが、残り5例は別の原因による高HDL-C血症であった。わが国における高HDL-C血症の成因でのCETP遺伝子異常の占める割合は大であり、今後、実際にヘテロ接合体を含めたCETP欠損症で動脈硬化症が少ないかどうかを検討しなければならないと思われる。

V：結論

CETP欠損症ではヘテロ接合体においても血中リポ蛋白は抗動脈硬化的であった。CETP遺伝子異常のスクリーニング法が開発され、わが国における高HDL-C血症の原因疾患としてのCETP欠損症の重要性が認識された。今後、CETP欠損症で実際に動脈硬化が抑制されているかの検討が重要である。

References :

- 1) Tall AR, Plasma lipid transfer proteins. *J.Lipid Res.*,27:361, 1986.
- 2) Koizumi J, Mabuchi H., Yoshimura A, Michishita I, Takeda M, Itoh H, Sakai Y, Sakai T, Ueda K, Takeda R, Deficiency of serum cholesteryl-ester transfer activity in patients with familial hyperalphalipoproteinaemia. *Atherosclerosis*, 58:175,1985.
- 3) Brown ML, Inazu A, Hesler CB, Agellon LB, Mann C, Whitlock ME, Marcel YL, Milne RW, Koizumi J, Mabuchi H, Takeda R, Tall AR, Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high density lipoproteins. *Nature* 342:448.1989.
- 4) Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, Takata K, Maruhama Y, Mabuchi H, Tall AR, Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N. Eng. J. Med.*, 323:1234, 1990
- 5) Marcel YL, McPherson R, Hogue M, Czarnecka H, Zawadzki Z, Weech PK, Whitlock ME, Tall AR, Milne RW, Distribution and concentration of cholesteryl ester transfer protein in plasma of normolipidemic subjects. *J.Clin. Invest.*, 85:10, 1990.
- 6) Bisgaier CL, Siebenkas MV, Brown ML, Inazu A, Koizumi J, Mabuchi H, Tall AR. Familial cholesteryl ester transfer protein deficiency is associated with triglyceride-rich low density lipoproteins containing cholesteryl esters of probable intracellular origin. *J.Lipid Res.* 32:21. 1991.

Table 1 :

CONCENTRATIONS OF SERUM AND LIPOPROTEIN LIPIDS AND CETP IN FAMILY MEMBERS WITH CETP DEFICIENCY

Values are mean \pm SD. n.s., not significant; n.d., not determined; ANOVA = analysis of variance. Comparisons between groups were determined by the Bonferroni *t*-method

	(A) Homozygous	(B) Heterozygous	(C) Unaffected	(D) Control	ANOVA (P)	(A) vs. (C) (P)	(B) vs. (C) (P)	(A) vs. (D) (P)	(B) vs. (D) (P)
Age (yrs)	58.7 \pm 5.5	51.5 \pm 14.5	32.9 \pm 15.5	34.7 \pm 16.3	< 0.01	< 0.01	n.s.	< 0.01	< 0.05
Sex (M/F)	1/5	5/5	3/5	8/12					
Serum (mmol/l)									
Unesterified									
chol.	2.07 \pm 0.54	1.35 \pm 0.23	1.07 \pm 0.14	1.01 \pm 0.16	< 0.001	< 0.01	n.s.	< 0.01	< 0.05
Esterified chol.	5.19 \pm 0.98	4.24 \pm 0.71	3.16 \pm 0.23	3.41 \pm 0.40	< 0.001	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Triglycerides	1.62 \pm 0.75	0.95 \pm 0.49	0.72 \pm 0.35	0.91 \pm 0.26	< 0.01	< 0.01	n.s.	< 0.05	n.s.
Phospholipids	4.36 \pm 0.91	2.97 \pm 0.43	2.41 \pm 0.20	2.37 \pm 0.34	< 0.001	< 0.01	n.s.	< 0.01	< 0.05
VLDL (<i>d</i> < 1.006, mmol/l)									
Unesterified									
chol.	0.25 \pm 0.18	0.11 \pm 0.08	0.08 \pm 0.03	0.12 \pm 0.06	< 0.05	< 0.05	n.s.	< 0.05	n.s.
Esterified chol.	0.12 \pm 0.05	0.12 \pm 0.06	0.12 \pm 0.04	0.21 \pm 0.11	< 0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Triglycerides	0.90 \pm 0.53	0.41 \pm 0.38	0.24 \pm 0.12	0.38 \pm 0.18	< 0.01	< 0.01	n.s.	< 0.01	n.s.
Phospholipids	0.32 \pm 0.18	0.18 \pm 0.12	0.13 \pm 0.07	0.20 \pm 0.08	< 0.05	< 0.05	n.s.	n.s.	n.s.
IDL (1.006 < <i>d</i> < 1.019, mmol/l)									
Unesterified									
chol.	0.05 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Esterified chol.	0.03 \pm 0.02	0.11 \pm 0.07	0.10 \pm 0.03	0.11 \pm 0.05	< 0.05	n.s.	n.s.	< 0.05	n.s.
Triglycerides	0.10 \pm 0.04	0.10 \pm 0.04	0.06 \pm 0.02	0.08 \pm 0.03	< 0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Phospholipids	0.08 \pm 0.03	0.10 \pm 0.04	0.07 \pm 0.02	0.08 \pm 0.03	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LDL (1.019 < <i>d</i> < 1.063, mmol/l)									
Unesterified									
chol.	0.73 \pm 0.26	0.73 \pm 0.17	0.58 \pm 0.14	0.57 \pm 0.12	< 0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Esterified chol.	1.55 \pm 0.43	2.04 \pm 0.61	1.49 \pm 0.39	1.73 \pm 0.26	< 0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Triglycerides	0.23 \pm 0.07	0.18 \pm 0.07	0.15 \pm 0.07	0.19 \pm 0.06	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Phospholipids	1.07 \pm 0.53	0.93 \pm 0.24	0.70 \pm 0.19	0.77 \pm 0.11	< 0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HDL (<i>d</i> > 1.063, mmol/l)									
Unesterified									
chol.	0.93 \pm 0.24	0.31 \pm 0.07	0.29 \pm 0.08	0.22 \pm 0.07	< 0.001	< 0.01	n.s.	< 0.01	n.s.
Esterified chol.	3.28 \pm 0.94	1.48 \pm 0.25	1.27 \pm 0.30	1.21 \pm 0.28	< 0.001	< 0.01	n.s.	< 0.01	n.s.
Triglycerides	0.10 \pm 0.03	0.12 \pm 0.03	0.14 \pm 0.03	0.18 \pm 0.06	< 0.01	n.s.	n.s.	< 0.01	< 0.05
Phospholipids	2.83 \pm 0.63	1.52 \pm 0.31	1.41 \pm 0.23	1.33 \pm 0.34	< 0.001	< 0.01	n.s.	< 0.01	n.s.
CETP (μ g/ml)	0.0 \pm 0.0	1.5 \pm 0.1	2.2 \pm 0.5	n.d.	< 0.001	< 0.01	< 0.01		

Table 2 :

MOLAR RATIOS OF LIPIDS IN EACH LIPOPROTEIN FRACTION

Values are mean \pm SD. n.s., not significant; ANOVA, analysis of variance. Comparisons between groups were determined by the Bonferroni *t*-method

	(A) Homozygous	(B) Heterozygous	(C) Unaffected	(D) Control	ANOVA (P)	(A) vs.(C) (P)	(B) vs.(C) (P)	(A) vs.(D) (P)	(B) vs.(D) (P)
VLDL (<i>d</i> < 1.006)									
EC/TG	0.19 \pm 0.17	0.38 \pm 0.16	0.57 \pm 0.18	0.59 \pm 0.24	< 0.01	< 0.01	n.s.	< 0.01	n.s.
PL/UC	2.18 \pm 2.16	1.61 \pm 0.38	1.62 \pm 0.44	1.88 \pm 0.48	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
EC+TG/UC+PL	1.89 \pm 0.28	1.76 \pm 0.27	1.66 \pm 0.39	1.84 \pm 0.31	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IDL (1.006 < <i>d</i> < 1.019)									
EC/TG	0.31 \pm 0.19	1.10 \pm 0.42	1.83 \pm 0.45	1.43 \pm 0.39	< 0.001	< 0.01	< 0.01	< 0.01	n.s.
PL/UC	1.58 \pm 0.52	1.85 \pm 0.51	1.40 \pm 0.35	1.98 \pm 0.56	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
EC+TG/UC+PL	1.03 \pm 0.18	1.30 \pm 0.29	1.32 \pm 0.22	1.52 \pm 0.44	< 0.05	n.s.	n.s.	< 0.05	n.s.
LDL (1.019 < <i>d</i> < 1.063)									
EC/TG	7.16 \pm 2.55	11.66 \pm 2.31	10.49 \pm 1.87	9.85 \pm 2.46	< 0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
PL/UC	1.42 \pm 0.18	1.28 \pm 0.10	1.20 \pm 0.08	1.38 \pm 0.16	< 0.05	< 0.05	n.s.	n.s.	n.s.
EC+TG/PL+UC	1.05 \pm 0.16	1.32 \pm 0.10	1.28 \pm 0.06	1.43 \pm 0.12	< 0.001	< 0.01	n.s.	< 0.01	n.s.
HDL (<i>d</i> > 1.063)									
EC/TG	40.39 \pm 17.97	12.82 \pm 3.14	9.55 \pm 2.39	7.28 \pm 2.40	< 0.001	< 0.01	n.s.	< 0.01	n.s.
PL/UC	3.08 \pm 0.26	4.95 \pm 0.69	5.10 \pm 0.89	6.40 \pm 1.61	< 0.001	< 0.05	n.s.	< 0.01	< 0.05
EC+TG/UC+PL	0.89 \pm 0.07	0.88 \pm 0.09	0.82 \pm 0.08	0.91 \pm 0.12	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Table 3 :

CORRELATION COEFFICIENTS BETWEEN CETP, AND LIPID CONCENTRATION AND MOLAR RATIO IN EACH LIPOPROTEIN FRACTION

	<i>r</i>	<i>P</i>		<i>r</i>	<i>P</i>
VLDL ($d < 1.006$)					
Unesterified chol.	-0.498	0.025	EC/TG	0.698	0.001
Esterified chol.	-0.025	0.918	PL/UC	-0.228	0.334
Triglycerides	-0.538	0.015	EC+TG/UC+PL	-0.201	0.395
Phospholipids	-0.516	0.020			
IDL ($1.006 < d < 1.019$)					
Unesterified chol.	-0.033	0.891	EC/TG	0.843	0.000
Esterified chol.	0.463	0.040	PL/UC	-0.068	0.774
Triglycerides	-0.312	0.181	EC+TG/UC+PL	0.400	0.080
Phospholipids	0.004	0.988			
LDL ($1.019 < d < 1.063$)					
Unesterified chol.	-0.156	0.513	EC/TG	0.512	0.021
Esterified chol.	0.134	0.574	PL/UC	-0.519	0.019
Triglycerides	-0.364	0.115	EC+TG/UC+PL	0.608	0.005
Phospholipids	-0.295	0.206			
HDL ($d > 1.063$)					
Unesterified chol.	-0.783	0.000	EC/TG	-0.739	0.000
Esterified chol.	-0.735	0.000	PL/UC	0.707	0.001
Triglycerides	0.603	0.005	EC+TG/UC+PL	-0.182	0.443
Phospholipids	-0.725	0.000			

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).

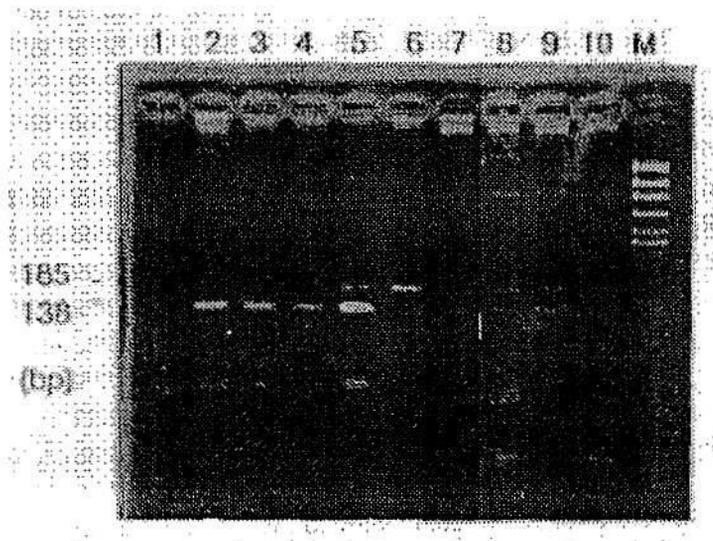
Fig. 1 :

**The sequences of the exon 14 - intron 14 boundary
of the CETP gene**

	normal	mutant
sequence	5'..... <u>CATGTCTC</u> g t a a g t g.....3'	5'.... <u>CATGTCTC</u> a t a a g t g3'
amplified sequenceCATGTCTCGTATGTG...CATGTCTCATATGTG
		<u> </u> Nde I

Fig. 2 :

**Rapid Detection Method of CETP Deficiency Due to the Intron
14 Splicing Defect with Mutagenic Primer Mediated Restriction
Map Modification**



Nde I digestion of the PCR products encompassing exon 14-intron 14 boundary of the CETP gene. After digestion with Nde I, the PCR products of the mutant allele only generate two fragments of 138bp and 47bp. Lane 1 is no template DNA in the assay. Normal subject(lane 6), heterozygote(lane 8,9,10), and homozygote(lane 2,3,4,5,7) for the G→A mutation were determined by direct sequencing. Right lane (M) is the molecular size marker of ϕ X/Hinc II. PCR products of a homozygote for the mutation(lane 5) were not completely digested, showing double bands of 185 and 138 bp. Another predicted DNA fragment of 47 bp was not clear on the agarose gel.

Table 5 :

Prevalence of the splicing defect among unrelated hyperalphalipoproteinemia

Group	No. of Individuals	No. of Alleles	No. of Homozygotes	No. of Heterozygotes	Total No. of the Mutant Allele	Mutant Allele Frequency
1. HDL-C 120-248 mg/dl	21	42	8	6	22	22/ 42(0.52)
2. HDL-C 100-119 mg/dl	25	50	0	4	4	4/ 50(0.08)
3. HDL-C 80-99 mg/dl	30	60	0	2	2	2/ 60(0.03)
4. HDL-C 60-79 mg/dl	33	66	0	1	1	1/ 66(0.01)
Total	109	218	8	13	29	29/218(0.13)

Fig. 3 :

Distribution of CETP Deficiency due to a Intron 14 Splicing Defect in Japan

