

コレステロールエステル転送蛋白と動脈硬化症との 関連についての研究

著者	小泉 順二
著者別表示	Koizumi Junji
雑誌名	昭和63(1988)年度 科学研究費補助金 一般研究(C) 研究成果報告書
巻	1987-1988
ページ	15p.
発行年	1989-03
URL	http://doi.org/10.24517/00049283

KAKEN

1988

23

コレステロールエステル転送蛋白と 動脈硬化症との関連についての研究

昭和63年度科学研究費補助金(一般研究C)
研究成果報告書

平成元年3月



研究代表者 小 泉 順 二

(金沢大学医学部附属病院 助手)



は し が き

研究組織

研究代表者	昭和62、63年度	小泉順二	(金沢大学医学部附属病院 助手)
研究分担者	昭和62、63年度	馬淵 宏	(金沢大学医学部 助教授)

研究経費

昭和62年度	1,000千円
昭和63年度	600千円
計	1,600千円



8000-07481-8

金沢大学附属図書館

研究発表

(1) 学会誌等

1. 馬 淵 宏、小 泉 順 二、吉 村 陽、道 下 一 朗
武 田 三 昭、梶 波 康 二、伊 藤 英 章、若 杉 隆 伸
竹 田 亮 祐、上 田 幸 生、竹 越 忠 美

Cholesteryl-ester transfer activity の欠損を示す家族性高HDL血症の1家系

動脈硬化 15 : 63-69, 1987.

2. 小 泉 順 二、道 下 一 朗、武 田 三 昭、藤 田 一
梶 波 康 二、稲 津 明 広、馬 淵 宏、竹 田 亮 祐
ホモ接合体性家族性高コレステロール血症患者での血漿交換療法によるHDLの増加と
LDL, HDLの脂質組成の変化

動脈硬化 16 : 53-57, 1988.

3. J Koizumi, A Inazu, H Fujita, M Takeda, Y Uno, K Kajinami, H Mabuchi,
R Takeda.

Removal of apolipoprotein E-enriched high density lipoprotein by LDL-apheresis
in familial hypercholesterolemia: a possible activation of the reverse
cholesterol transport system.

Atherosclerosis 74 : 1-8, 1988.

(2) 口頭発表

1. 小 泉 順 二、道 下 一 朗、武 田 三 昭、藤 田 一
梶 波 康 二、稲 津 明 広、竹 田 亮 祐
ホモ接合体性家族高コレステロール血症患者での血漿交換療法によるHDLの増加と
LDL, HDLの脂質組成の変化

昭和62年度日本動脈硬化学会総会（東京）July.9.1987

2. 稲 津 明 広、小 泉 順 二、武 田 三 昭、馬 淵 宏
竹 田 亮 祐、上 田 幸 生、竹 越 忠 美

異なる発症機序を持つと考えられる家族性高 α リポ蛋白血症の2例

（アガロースゲル電気泳動を利用したCETAの測定）

昭和62年度日本動脈硬化学会総会（東京）July.9.1987

3. 小泉 順二、 稲津 明広、 梶波 康二、 伊藤 英章
馬 淵 宏、 竹田 亮祐
家族性高コレステロール血症におけるアポE含有リポ蛋白の異常
第29回日本老年医学会総会（大阪）Oct. 2, 1987
4. 小泉 順二、 宇野 欣秀、 稲津 明広、 藤田 一
梶波 康二、 武田 三昭、 馬 淵 宏、 竹田 亮祐
ホモ接合体性家族性高コレステロール血症におけるアポEリポ蛋白の増加と
LDLアフェレーシスの影響
昭和62年度日本動脈硬化学会冬季大会（東京）Dec. 3, 1987
5. 稲津 明広、 宇野 欣秀、 藤田 一、 梶波 康二
武田 三昭、 伊藤 英章、 小泉 順二、 馬 淵 宏
竹田 亮祐
家族性高コレステロール血症におけるコレステリル・エステル転送活性
第20回日本動脈硬化学会総会（福岡）Jun. 3 - 4, 1987.
6. 稲津 明広、 藤田 一、 梶波 康二、 宇野 欣秀
武田 三昭、 小泉 順二、 馬 淵 宏、 竹田 亮祐
糖尿病におけるコレステリルエステル転送活性
第31回日本糖尿病学会総会（東京）May 26 - 28, 1988.
7. 小泉 順二、 稲津 明広、 宇野 欣秀、 藤田 一
梶波 康二、 武田 三昭、 伊藤 英章、 馬 淵 宏
竹田 亮祐、 竹越 忠美
家族性高HDL血症におけるコレステリルエステル転送蛋白遺伝子の多型性
第20回日本動脈硬化学会総会（福岡）Jun. 3 - 4, 1988.
8. 小泉 順二、 稲津 明広、 宇野 欣秀、 武田 三昭
末松 哲男、 清水 賢巳、 馬 淵 宏、 竹田 亮祐
冠動脈硬化における低HDL血症 高アポB血症とHDL-C / アポA I比との関連に
ついて
第30回日本老年医学会総会（長崎）Sep. 30 - Oct. 1, 1988.

9. J Koizumi, A Inazu, H Fujita, M Takeda, Y Uno, K Kajinami, H Mabuchi, R Takeda.

The removal of apo-E enriched high density lipoprotein by LDL-apheresis in familial hypercholesterolemia: a possible activation of reverse cholesterol transport system.

8 th international Symposium of Atherosclerosis. (Rome) Oct. 9 -13,1988.

10. A Inazu, J Koizumi, Y Uno, H Fujita, K Kajinami, M, Takeda, H Mabuchi, R Takeda.

Enhanced cholesteryl ester transfer activity in heterozygous familial hypercholesterolemia.

8 th international Symposium of Atherosclerosis. (Rome) Oct. 9 -13,1988.

研究成果

I : 研究の目的

コレステロールエステル転送蛋白 (CETP) は高比重リポ蛋白 (HDL) より超低比重リポ蛋白 (VLDL)、中間比重リポ蛋白 (IDL)、低比重リポ蛋白 (LDL) などのアポB含有リポ蛋白 (Lp-B) へコレステリルエステル (CE) を転送する働きを有する¹⁾。この活性の低下はHDLコレステロール (HDL-C) の増加を生じ、活性増加はHDL-Cの低下となると思われる。HDL-Cの低値は動脈硬化症の危険因子とされており、HDLを中心としたコレステロール逆転送系と動脈硬化との関連において、CETPは重要である。今回、我々は冠動脈硬化とHDLの変化を冠動脈造影所見より検討し、さらに若年より動脈硬化症を発症する家族性高コレステロール血症患者 (FH) でコレステロールエステル転送活性 (CETA) を測定した。また、CETPの変化を遺伝子レベル検討するために、CETP遺伝子の多型性 (RFLP) を検討した。さらに、動脈硬化を生じにくいと考えられるCETAの完全欠損を示す家族性高HDL血症患者²⁾のRFLPも検討し、CETPとHDLの関係を考察した。

II : 研究方法

1) 冠動脈硬化とHDLの変化について

FH以外の選択的冠動脈造影が施行された65例の男性で、TC、TG、HDL-Cおよびアポ蛋白を測定し、冠動脈狭窄度 (CAI) との関連を重回帰分析 (stepwise forward selection method) により検討した。CAIは冠動脈を15分画に分けそれぞれの狭窄の%をスコア化し、その総和より算出した。狭窄の%が25%未満を1、50%未満を2、75%未満を3、75%以上を4として計算した。LDLコレステロール (LDL-C) は $TC - HDL - C - TG / 5$ の式で計算した³⁾。

2) 家族性高コレステロール血症患者 (FH) におけるCETAとアポE含有HDL (E-HDL) について

比重1.215以上のリポ蛋白を含まない血清分画を超遠心法で分離し、DTNB1.4mMの存在下、LCAT活性を抑制した状態で、³H-CEで標識したHDL₃とLDLとで37度で incubation し、ヘパリン-Mn²⁺でLDLを沈澱分離し、CETAを測定した。また、血清の5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を行い、その後ニトロセルロース膜に転写し、抗アポE抗体でイムノプロットしてE-HDLを検討した⁴⁾。さらに、比重1.063以上分画を超遠心法で分離し、SRID法でアポE/アポA I比を測定した。

3) CETP遺伝子のRFLPについて

Dr.Drayna より提供されたCETPの cDNA⁵⁾をプローブとしてCETP遺伝子のTaq I

制限酵素によるRFLPを検討した。末梢血10mlより Triton X-100 lysis method の変法により genomic DNAを採取し、Taq I 制限酵素で切断後、Southern ブロッキングを行った⁶⁾。

Ⅲ：結果

1) 冠動脈硬化とHDLの変化について

冠動脈造影所見より、狭窄度をスコア化して算出したCAIはLDL-C ($P<0.05$) アポB ($P<0.01$) と正相関、HDL-C ($P<0.01$)、HDL-C/AI比 ($P<0.01$) と負相関を示した(表1)。重回帰分析の結果でもHDL-CはCAIと有意の負の相関を示した(表2)。このHDL-CおよびHDL-C/AIの比の変化はアポB値と有意の負の相関を示した(表3)。従って、冠動脈硬化の危険因子としてのHDL-Cの低下には、HDL自体の低下の他に、LP-Bの増加による影響が示唆された。

2) 家族性高コレステロール血症患者(FH)におけるCETAとアポE含有HDL(E-HDL)について

FH患者における比重1.063以上分画のアポE/アポA I比は正常者より増加しており、E-HDLの増加がヘテロ接合体およびホモ接合体FHで示唆された(表4)。ホモFHの血清の5%PAGEとイムノプロットで、大粒子のE-HDLの増加が示され(図1)、この粒子はLDL-apheresisにより除去された⁴⁾。

ヘテロFH ($n=29$) のリポ蛋白を含まない比重1.215以上の分画のCETAは正常より高値であり、ホモFHでは正常の4倍の高値であった(表5)。また、CETAとHDL-C/AI比とは負の相関が認められた($r=-0.409$ 、 $P<0.01$)。

3) CETP遺伝子のRFLPについて

CETP遺伝子はTaq I制限酵素により2種のRFLPを示した(A:9.0kb/7.5kb、5.3kb/4.4kb)。CETAの欠損している家族性高HDL血症患者のRFLPを検討した。完全欠損と考えられた発端者(SY)においてもCETP遺伝子は存在し、7.5kbと4.4kbのホモ接合であった(図2)。この家系内でのHDL-Cの高値とRFLPのタイプとの間に関係は認められなかった(図3)。他の家系(Yo.S)でも同様であった。

FHでのCETP遺伝子のRFLPが同様に検討された。各alleleの出現とCETAおよびHDL-C/AI比との間には明かな関係は認められなかった(表6)。しかし、7.5kbと5.3kbがみられるタイプでHDL-C/AI比が低下する家系が存在し、HDLの変化に対するCETP遺伝子の関与が示唆された(図4)。

IV : 考察

CETPはHDLよりLP-BへCEを転送する働きを有する。HDLは末梢組織より遊離コレステロール(FC)をとりこみ、LCATの作用によりFCはECに変化する⁷⁾。また、HDLのCEは上述のCETPによりLP-Bへ転送される。このいわゆるコレステロール逆転送系でのCETPの働きは、HDLのCEの過剰の蓄積を除去し、FCをより取り込み易くする作用と、LP-BのCEを増加する作用の両方が考えられる。HDLへの作用は動脈硬化を改善する方向と考えられるが、LP-BのCEの増加は動脈硬化促進と考えられる。従って、FHのようにLP-Bの増加している場合は、CETAの亢進は動脈硬化促進に作用していると考えられる。また、コレステロール逆転送系での他の重要なリポ蛋白であるE-HDLもFHで増加しており肝でのE-HDL代謝障害が示唆され、FHでのコレステロール逆転送系は有効に作用していないと推測される。

HDL-Cの低下にはLP-Bの増加が重要であることは、FH以外の冠動脈硬化患者での検討で、CEの転送での acceptor であるLP-Bの増加がHDL-Cの低下にかかわっているとの結果より示唆された。しかし、FHでCETAの亢進が認められ、CETAとHDL-C/AI比との間には逆相関が認められること、他のⅢ型高脂血症でもCETPの増加の報告⁸⁾があることより、動脈硬化を促進するすべての高脂血症でCETPの増加もHDLの変化に関与している可能性が示唆された。

CETAおよびHDL-Cの変化に対するCETP遺伝子の関与がCETPcDNAをプローブとして検討された。CETAを欠損する家族性高HDL血症患者での検討ではRFLPのタイプとHDL-CおよびCETAとの間に明かな関係は認められなかった。FHでのCETP遺伝子のTaqI制限酵素によるRFLPとCETAおよびHDL-C/AI比との間にも有意の関係は認められなかった。しかし、家系によっては関係の見られる場合もありCETPの遺伝子レベルでの活性への影響も考えられた。今回検討されたのはTaqI制限酵素による2種のRFLPのみであり、今後さらに遺伝子の塩基配列のレベルでの検討が必要と思われる。

V : 結論

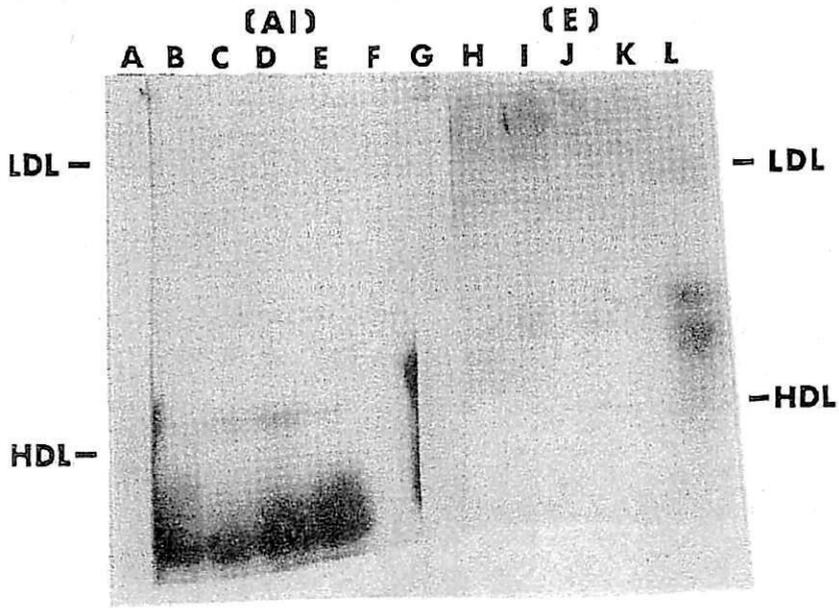
CETPはFHを含め高脂血症では増加しており、HDL-Cの低下とLP-BのCEの増加に関与し、動脈硬化に促進的に働くと考えられた。

References:

- 1) Tall, A.R., Plasma lipid transfer proteins. *J.Lipid Res.*, 27:361, 1986.
- 2) Koizumi, J., Mabuchi, H., Yoshimura, Michishita, I., Takeda, M., Itoh, H., Sakai, T., Ueda, K. and Takeda, R., Deficiency of serum cholesteryl-ester transfer activity in patients with familial hyperalphalipoproteinaemia. *Atherosclerosis*, 58:175, 1985.
- 3) Friedewald, W.T., Levy, R.I. and Fredrickson, D.S., Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin.Chemistry*, 18:499, 1972.
- 4) Koizumi, J., Inazu, A., Fujita, H., Takeda, M., Uno, Y., Kajinami, K., Mabuchi, H. and Takeda, R. Removal of apolipoprotein E-enriched high density lipoprotein by LDL-apheresis in familial hypercholesterolemia: a possible activation of the reverse cholesterol transport system. *Atherosclerosis*, 74: 1, 1988.
- 5) Drayna, D., Jarnagin, A.S., Mclean, J., Henzel, W., Kohr, W., Fielding, C. and Lawn, R., Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA. *Nature*, 327:623, 1987.
- 6) Southern, E.M., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.*, 98:503, 1975.
- 7) Mackinnon, A.M., Drevon, C.A., Sand, T.M. and Davis, R.A., Regulation of bile acid synthesis in cultured rat hepatocytes: stimulation by apo E-rich high density lipoproteins. *J.Lipid Res.*, 28:847, 1987.
- 8) Tall, A.R., Granot, E., Brocia, R., Tabas, I., Hesler, C., Williams, K. and Denke, M., Accelerated transfer of cholesteryl esters in dyslipidemic plasma. Role of cholesteryl ester transfer protein. *J.Clin.Invest.*, 79:1217, 1987.

☒ 1

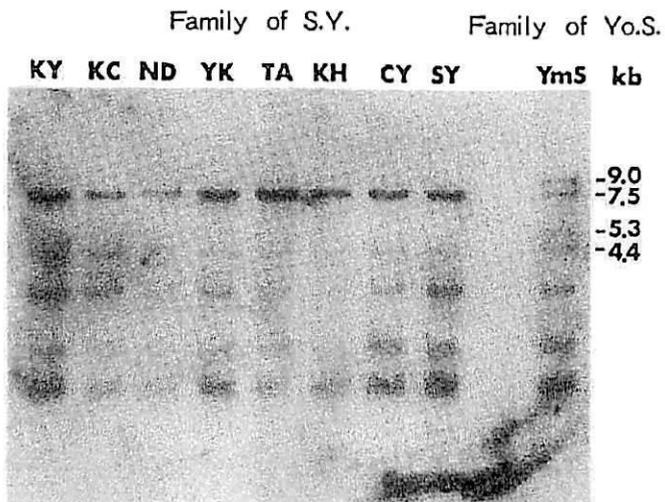
Change of Apo AI and E - containing Lipoproteins by LDL-apheresis on Homozygous Patient with FH



A : Normal(lipid stain), G : Homo-FH(lipid stain)
 B,H,: Normal,
 C,D,I,J,: Homo-FH, Before LDL-apheresis,
 E,K,: Homo-FH, After LDL-apheresis,
 F,L,: Lipoproteins adsorbed in Liposorber,

☒ 2

RFLP in Familial Hyperalphalipoproteinemia



☒ 4

Haplotypes Defined by Taq I and HDL-C/AI
Mass Ratio in the Family of ZY

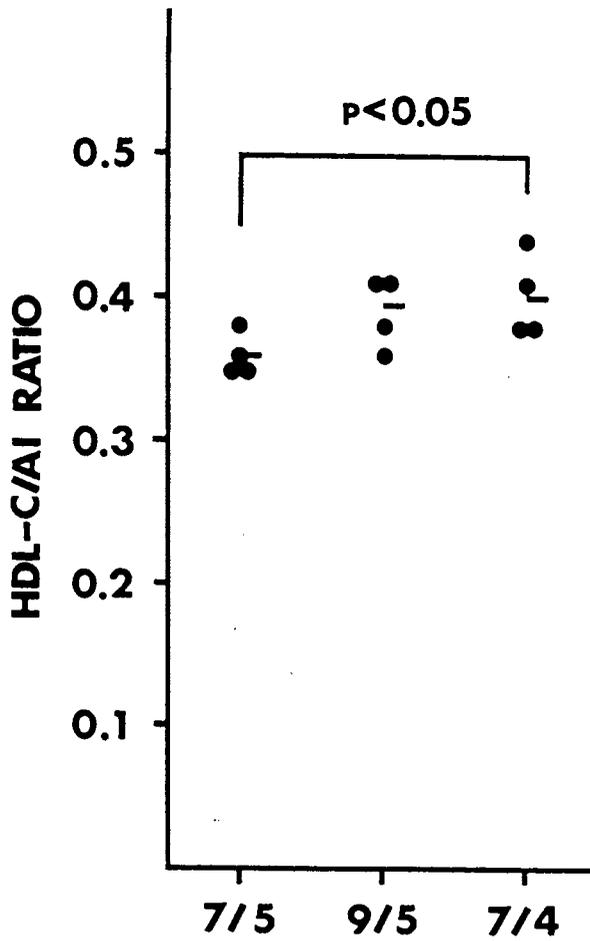


Table 1

CORRELATION COEFFICIENTS IN MALE PATIENTS (n=55)

between CAI and NONLIPID RISK FACTORS

	Age	BMI	GTT	HT
r	0.245	0.148	0.213	0.074
p	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

between CAI and SERUM LIPID AND APOPROTEIN CONCENTRATIONS

	TCH	TG	LDL-C	HDL-C	apoAI	apoAII	apoB	apoCII	apoCIII	apoE	HDL-C/apoAI	apoAI/apoAII
r	0.257	0.258	0.285	-0.398	-0.220	-0.037	0.368	0.161	-0.001	0.021	-0.361	-0.186
p	n.s.	n.s.	<0.05	<0.01	n.s.	n.s.	<0.01	n.s.	n.s.	n.s.	<0.01	n.s.

Table 2

RESULT OF STEPWISE MULTIPLE REGRESSION ANALYSIS
(Stepwise forward selection method)

CAI	Patial Regression Coefficient	Standard Partial Regression Coefficient	p
Age	0.25	0.26	<0.05
TCH	0.090	0.37	<0.01
HDL-C	-0.28	-0.39	<0.01
apoE	-1.36	-0.20	n.s.

$$CAI = -8.28 + 0.25xAge + 0.090xTCH - 0.28xHDL-C - 1.36xapoE$$

Table 3

CORRELATION COEFFICIENTS AMONG SERUM LIPID AND APOPROTEIN CONCENTRATIONS IN MALE PATIENTS (n=65)

	TCH	TG	LDL-C	HDL-C	apoAI	apoAII	apoB	apoCII	apoCIII	apoE
HDL-C	0.077	-0.349 ^a	-0.103	1	0.629 ^a	0.319 ^b	-0.365 ^a	-0.003	0.133	-0.031
apoAI	0.199	-0.027	0.003	0.629 ^a	1	0.617 ^a	-0.108	0.238	0.374 ^a	0.135
HDL-C/apoAI	-0.112	-0.453 ^a	-0.166	0.748 ^a	-0.029	-0.102	-0.428 ^a	-0.250 ^b	-0.170	-0.182

a : p<0.05, b : p<0.01

Table 4

ApoE/ApoAI MOLAR RATIOS OF d>1.063 SERUM FRACTION ON PATIENTS WITH FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA AND OTHER TYPE II PRIMARY HYPERLIPOPROTEINEMIA.

	Sex M/F	TC mg/dl	TG mg/dl	HDL-C mg/dl	B mg/dl	E mg/dl	AI mg/dl	E/AI molar ratio in d>1.063 fraction
Homo-FH	M	556 ^c	204 ^b	33 ^a	309 ^c	9.2 ^c	107 ^a	0.069 ^c
	F	507	191	18	338	8.9	69	0.072
Hetero-FH	3/4	392 ± 16 ^c p<0.001	149 ± 25 ¹ ns	42 ± 2 ¹ ns	187 ± 11 ^c p<0.05	5.5 ± 0.4 ^b ns	113 ± 5 ¹ ns	0.016 ± 0.002 ¹ p<0.05
Other Type II	7/2	236 ± 5 ^c	209 ± 25 ^b	39 ± 4 ^a	152 ± 6 ^c	4.7 ± 0.4 ¹	122 ± 7 ¹	0.009 ± 0.001 ¹
Normal	5/1	182 ± 9	104 ± 13	54 ± 5	86 ± 8	3.6 ± 0.3	134 ± 7	0.011 ± 0.002

a : p<0.05; b : p<0.01, c : p<0.001,
mean ± SE

Table 5. Cholesteryl ester transfer activities in familial hypercholesterolemia.(mean \pm SE)

Cholesteryl ester transfer activity	
Normal(n=19)	54 \pm 6 nmol/nl/h
Heterozygous FH(n=29)	79 \pm 4 nmol/ml/h
Homozygous FH(n=1)	226 nmol/ml/h

Table 6

Serum Lipid Levels, CETA and CETP Genotype in FH								
No	Age	M/F	TC mg/dl	TG mg/dl	HDL-C mg/dl	HDL-C/AI	CETA nmol/ml/h	
9kb(-)	15	54 \pm 3	6/9	349 \pm 20	144 \pm 17	41 \pm 4	0.36 \pm 0.02	74 \pm 6
9kb(+)	4	54 \pm 12	2/2	319 \pm 31	92 \pm 7	33 \pm 6	0.33 \pm 0.04	69 \pm 13
5kb(-)	7	58 \pm 4	4/3	341 \pm 30	117 \pm 20	41 \pm 8	0.37 \pm 0.04	81 \pm 9
5kb(+)	10	53 \pm 4	5/5	350 \pm 25	130 \pm 10	38 \pm 4	0.35 \pm 0.03	67 \pm 6
								mean \pm SE