

日本人虚血性心疾患におけるアポリポ蛋白 遺伝子多型の関与

大 倉 義 文

広島大学医学部内科学第一講座 (主任: 梶山悟朗教授)

受付 平成 7 年 11 月 2 日

受理 平成 7 年 12 月 28 日

虚血性心疾患と脂質代謝異常との関連について Framingham Study を始め多くの報告がある。アポリポ蛋白遺伝子・脂質関連酵素遺伝子解析と脂質代謝・冠動脈疾患との関連についても多くの報告があるが、日本人を対象とした報告、特に冠動脈疾患との関連についての知見は乏しい。遺伝子解析の方法として疾患群と正常群とを比較する Association study と冠動脈病変の重症度の評価により、日本人虚血性心疾患患者におけるアポリポ蛋白多型と血清脂質関連項目・冠動脈病変との関連を明らかにすることを目的とし以下の検討を行った。

当科にて冠動脈疾患を疑い冠動脈造影検査を施行した80症例 (M: F=48: 32, 平均年齢 57.1歳)を 対象とし, AHA Comitte Report に基づき冠動脈狭窄度により3群に分類し, また冠動脈重症度の 2つの指標を算出し検討に用いた。血清脂質関連項目として総コレステロール (以下 TC), 中性脂肪 (以下 TG), 高比重リポ蛋白コレステロール (以下 HDL-C), アポリポ蛋白 AI, AII, B, CII, CIII, E (以下 Apo AI, apo AII, apo B, apo CII, apo CIII, apo E), Lipoprotein (a) (以下 Lp(a)), Remnant like particle-cholesterol (以下 RLP-C) を定量した。アポリポ蛋白遺伝子多型は apo AI/CIII/AIV 遺伝子多型 [*Msp* I, *Sac* I restriction fragment length polymorphism (以下 RFLP)], apo B 遺伝子多型 [*Xba* I RFLP, signal peptide (以下 SP)多型, variable number of tandemly repeated short DNA sequences (以下 VNTR)多型], apo E 遺伝子多型の6つについて polymerase chain reaction (以下 PCR)法を用い同定した。アポリポ蛋白遺伝子多型と血清脂質関連項目・冠動脈病変との関連を統計解析し以下の結果を得た。

- 1) 血清 LDL-C, LDL-C/HDL-C 比, ApoB/ApoAI 比は, 冠動脈狭窄を有する患者群で高値であり, また冠動脈病変重症度と有意な相関を認めた。
- 2) Apo AI/CIII/AIV 遺伝子多型のうち *Sac* I RFLP の S_2 allele は RLP-C の有意な高値を示し, TG 異化障害との関連が示唆された。
- 3) 女性の subgroup において, Apo B 遺伝子多型と血清 apo B 値, apo B/apo AI 比との関連が認められた。
- 4) Apo E 遺伝子多型の E4 カテゴリー($\epsilon 3/4, \epsilon 4/4$) は, E3 カテゴリー($\epsilon 3/3$)に比し血清 LDL-C 値, LDL-C/HDL-C 比, ApoB/ApoAI 比の高値を示し, apo E 遺伝子のコレステロール転送系への遺伝的関与が確認された。
- 5) 女性の subgroup 特に55才以上の閉経期女性において Apo B 遺伝子 SP 多型と冠動脈病変重症度との関連が認められた。

以上よりアポリポ蛋白遺伝子多型は日本人において血清脂質・冠動脈疾患を規定する因子であることが示唆された。特に Apo B 遺伝子 SP 多型は閉経期女性の血清 apo B 値とそれに起因する冠動脈疾患において重要な役割をなすことが推論された。

Key words : Apolipoproteins, Genetics, Polymorphism, Atherosclerosis

多くの疫学的研究により血清 LDL-C, apo B 高値および血清 HDL-C, apoAI 低値は、冠動脈疾患や動脈硬化性疾患の危険率増加と相関のあることが確立されてきた^{19,37)}。さらに高中性脂肪血症も血清 HDL 低値、凝固能亢進・高インスリン血症と関連して冠動脈疾患の危険因子として評価されている⁵⁰⁾。

アポリポ蛋白はリポ蛋白の構造蛋白として、脂質代謝関連酵素の補酵素として、またリポ蛋白受容体のリガンドとして脂質代謝において中心的かつ広範囲に役割を演じている^{8,12,44)}。そのゆえ主要アポリポ蛋白をコードしている遺伝子は冠動脈疾患を規定する因子として研究されてきた。ここ十年来、多くの研究によりアポリポ蛋白遺伝子多型が血清脂質値の差や冠動脈疾患の罹患頻度の差を説明するものとして報告されてきた^{4,22,40)}。確立された結論には至っていない^{18,38)}。さらに、日本人は遺伝的に *homogeneity* を示す人種であり、また近年冠動脈疾患による死亡率が増加してきているにもかかわらず、日本人を対象としたアポリポ蛋白遺伝子多型と血清脂質や冠動脈疾患、特に冠動脈造影上評価した冠動脈重症度との関連を明らかにした研究は少ない。

Apo AI/CIII/AIV 遺伝子については、血清 TG 高値、HDL 低値や虚血性心疾患と関連して多くの遺伝子多型の研究がなされている^{3,45,54)}。Apo AI と apo CIII の遺伝子は第11染色体長腕の同一遺伝子クラスター内に存在し²⁰⁾、前者は HDL の主要構成蛋白であり、また後者は TG 水解を担うリポ蛋白リパーゼの阻害作用を有する。

Apo B は主要なコレステロール運搬リポ蛋白である LDL の構成蛋白であり、LDL 受容体の生理的なりガンドである^{12,35)}。さらに Apo B は小腸からの Chylomicron、肝からの VLDL の分泌機構において必須であり⁴⁴⁾、TG-rich リポ蛋白合成において重要な役割を演じている。Apo B 遺伝子の *Xba* I RFLP はいくつかの対象において血清コレステロール値・TG 値や冠動脈疾患と関連することが報告されている^{2,7,17,18,20,34,40,41,46,49,52)}。しかしながら日本人を対象とした研究では遺伝子多型の allele 頻度が他の人種の頻度と全く異なり有意な関連も示されていない²⁾。新しい apo B 遺伝子多型として5個の SP 多

型と3'側の VNTR 多型についていくつかの *association study* がなされている^{9-11,16,21,32,36,56)}、日本人を対象とした冠動脈重症度との関連についてはほとんど研究されていない。

Apo E は TG-rich リポ蛋白の主要蛋白であり動脈硬化作用を有する Remnant 蛋白の血液中からの除去に大きな役割を担っている^{13,23,55)}。Apo E には E2, E3, E4 の3つのアイソフォームが存在し、それぞれ $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ allele によりコードされている²⁷⁾。これらの3つの allele により6つの genotype が規定される。すなわち $\epsilon 2/2$, $\epsilon 2/3$, $\epsilon 2/4$ (E2 カテゴリー), $\epsilon 3/3$ (E3 カテゴリー), $\epsilon 3/4$, $\epsilon 4/4$ (E4 カテゴリー) である。E4 カテゴリーでは血清コレステロール、TG、LDL-C 高値との関連が報告されている^{14,25,28,30,31,33,43,47,55)}。本研究の目的は日本人におけるアポ蛋白遺伝子多型と脂質代謝・冠動脈疾患重症度との関連について明らかにすることである。

材料と方法

1) 対象：平成5年4月から平成6年3月にかけて冠動脈疾患を疑い冠動脈造影検査を施行した80症例 (M: F=48: 32, 平均年齢 57.1歳) を本研究の対象とした。血清脂質の評価のため降圧剤・高脂血剤内服患者や腎機能障害患者・IDDM 患者は対象より除外した。冠動脈造影上硬化性変化を全く認めない症例 (Group I, n=38), AHA 分類上⁵⁾ 90%未満の硬化性病変を有する症例 (Group II, n=18), 90%以上の有意狭窄を認める症例 (Group III, n=26) の3群に分類し検討に用いた。Group II, Group III のうち19例が労作性狭心症、21例が血管攣縮性狭心症、14例が心筋梗塞合併例であった。データとして *body mass index* (以下 BMI) の算出のために身長・体重や、収縮期・拡張期血圧、喫煙・アルコールの嗜好について検討した。

2) 冠動脈重症度：冠動脈造影検査は Judkins technique を用いた。冠動脈を AHA Comittee Report に基づき15分節に分類し以下の2つの方法により重症度を評価した。(i) *Coronary Score* (以下CS): Jenkins 変法²⁶⁾により各分節の狭窄度に対して 0-24%=0, 25-49%=4, 50-74%=8, 75-89%=9, 90-99%=10, 100%=10 の score を対応させ、15分節毎の score を加算

Abbreviation, TC: total cholesterol, TG: triglyceride, VLDL: very low density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein, LDL-C: LDL-cholesterol, HDL: high density lipoprotein, Apo: apolipoprotein, Lp(a): Lipoprotein (a), RLP-C: Remnant like particle-cholesterol, BMI: body mass index, RFLP: restriction fragment length polymorphism, PCR: polymerase chain reaction, SP: signal peptide, VNTR: variable number of tandem repeat

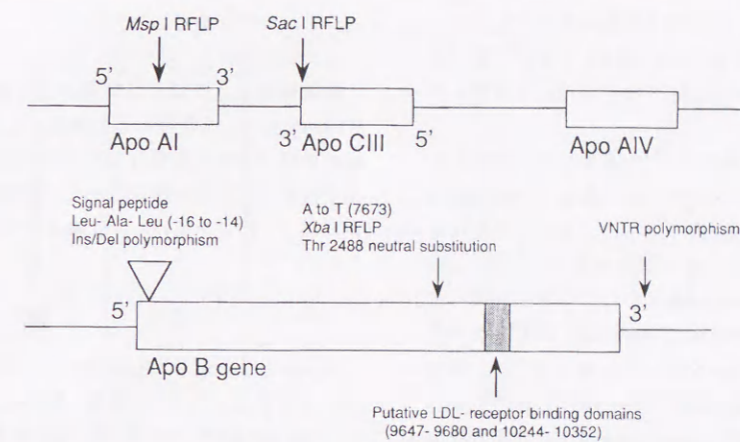


Fig. 1. Map of the apo AI/CIII/AIV gene cluster and apo B gene showing approximate positions of the DNA polymorphisms used in this study.

Numbers in brackets indicate the numbering of nucleotides of the cDNA relative to the transcriptional starting site which is 1. The open box represents the transcribed region of the apolipoproteins gene. The horizontal lines represent untranscribed regions of the genes.

して CS を求めた。(ii) *Coronary Index* (以下CI): 硬化性病変の血行動態の評価のために Balcon 変法⁶⁾を用い CI を算出した。正常冠動脈造影例は CI=100 であり、すべての分節が完全閉塞の造影像は CI=0 となる。

3) 血清脂質項目：早朝空腹時に採取した血液を室温にて低速遠心分離し血清サンプルを得た。TC, TG は酵素法により、また HDL-C は沈殿法により測定した。LDL-C は Friedewald の式¹⁵⁾を用い算出した。Apo AI, apo AII, apo B, apo CII, apo CIII, apo E の定量は TIA 法を用い²⁴⁾、Lp (a) は Tint Eliza Lp (a) (Biopool Co., Sweden)を用い ELISA 法により求めた¹⁾。RLP-C は免疫沈着法にて定量した⁴²⁾。

4) 遺伝子多型：Genomic DNA は末梢白血球より分離した³⁹⁾。PCR 増幅法⁴⁸⁾を用い、apo AI/CIII/AIV 遺伝子 (*Msp* I, *Sac* I RFLP), apo B 遺伝子 (*Xba* I RFLP, SP 多型, VNTR 多型), apo E 遺伝子多型の6つの遺伝子多型について検討した。apo AI/CIII/AIV と apo B 遺伝子多型の相対的位を Fig.1 に示す。PCR 用の oligonucleotide primer は applied Biosystems model 381A DNA synthesizer にて合成した。それぞれの primer の塩基配列を Table 1 に示す。DNA 増幅は 100 ng genomic DNA, 20 pmol の primer, 0.5 unit の Recombinant Taq polymerase (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Connecticut, USA) を用いた。

Msp I 多型の PCR は 96°C × 30秒の denature, 58°C

× 60秒の annealing, 72°C × 3分の extension を 30 cycle 繰り返した。*Sac* I 多型と *Xba* I 多型の PCR 条件は 96°C × 30秒の denature, 62°C × 60秒の annealing, 72°C × 2分の extension の 30 cycle であった。*Msp* I,

Table 1. Sequence of oligonucleotide primers

Primer	Sequence (5'→3')
Apo A I/C III/A IV gene:	
<i>Msp</i> I-5'	CAGCGGCAGAGACTATGTGT
<i>Msp</i> I-3'	CGTTGTGCAGCTGGACCGA
<i>Sac</i> I-5'	CTGACTGGTGTCTCCAGTG
<i>Sac</i> I-3'	CCAGAAGGTGGATAGAGCGC
Apo B gene:	
<i>Xba</i> I-5'	CCGTGAGGTGACTCAGAGAC
<i>Xba</i> I-3'	AGGCAGGCATGGTCCCAAGG
SP-5'	CAGCTGGCGATGGACCCCGCA
SP-3'	TTCGGCCCTGGCGCCCGCAGCA
VNTR-5'	ATGGAAACGGAGAAATTATGGAGG
VNTR-3'	CCTTCTCACTTGGCAAATAC
Apo E gene:	
5'	GCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGC
3'	GGCGCTCGCGATGGCGCTGAG

Sac I, *Xba* I 制限酵素による digestion は不十分な digestion を避けるために 10 unit (Takara shuzo),

Kyoto, Japan) を用い37°C×3時間の条件で行った。4.5% polyacrylamide gel にて200V×1時間の電気泳動を行い Ethidium bromide で染色後遺伝子多型を判定した。

apo B 遺伝子 SP 多型の PCR 条件は7% DMSO を加え denature を96°C×30秒, annealing と extension を 65°C×2分30 cycle 繰り返した。遺伝子多型判定は8% polyacrylamide gel の電気泳動で行った。apo B VNTR 多型では Boerwinkle の方法に準じた¹¹⁾。すなわち PCR は96°C×60秒の denature, 60°C×2分の annealing と extension を30 cycle 繰り返した。PCR product に95% formamide, 20mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF の混合液を等量加え10分沸騰後急冷することにより single strand にし, 7M urea 入りの4% polyacrylamide gel にて電気泳動を施行した。allele の同定には DNA repeat の数に対応した Boerwinkle の命名法を採用した¹⁰⁾。すなわち35回のrepeatの場合は'β35と命名した。

apo E 遺伝子多型は Tsukamoto らの方法³³⁾に準じて PCR 法にて同定した。ε2/2, ε2/3, ε2/4を E2 カテゴリー, ε3/3を E3 カテゴリー, ε3/4, ε4/4を E4 カテゴリー

Table 2. Means and standard deviations for lipid traits in the study groups

Trait		Group I (n=38)	Group II (n=16)	Group III (n=26)	P from Kruskal-Wallis test
		Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	
Age	(years)	53.1±15.2	59.3± 9.5	59.9± 9.0	NS
BMI	(kg/m ²)	23.2± 2.8	23.6± 2.9	23.4± 3.1	NS
Total cholesterol	(mg/dl)	188±40.7	228± 48.6 ^{a)}	204±44.1	<0.01
Triglycerides	(mg/dl)	146±82.5	188±104.3	135±76.0	NS
HDL-C	(mg/dl)	43.1±17.2	40.8± 14.6	38.5±11.4	NS
LDL-C	(mg/dl)	116±36.3	150± 41.8 ^{a)}	139±44.1 ^{b)}	<0.001
LDL-C/HDL-C		3.0± 1.3	4.3± 2.7 ^{a)}	3.9± 1.6 ^{b)}	<0.01
Apo AI	(mg/dl)	122±22.5	124± 28.1	114±22.5	NS
Apo AII	(mg/dl)	33.9± 7.5	34.6± 6.2	29.6± 6.7	NS
Apo B	(mg/dl)	105±27.1	132± 32.5 ^{a)}	115±24.4	<0.01
Apo CII	(mg/dl)	5.3± 3.0	6.1± 4.9	5.1± 2.8	NS
Apo CIII	(mg/dl)	10.2± 5.9	13.6± 7.8	9.2± 4.6	NS
Apo E	(mg/dl)	6.4± 2.0	8.3± 3.8	6.6± 2.3	NS
Apo B/Apo AI		0.88± 0.27	1.13± 0.43 ^{a)}	1.06± 0.34 ^{b)}	<0.05
RLP-C	(mg/dl)	7.26± 7.39	7.37± 4.58	8.85± 7.73	NS

^{a)} Significantly different from Group I at p<0.01

^{b)} Significantly different from Group I at p<0.05

NS = not significant.

ゴリーに分類し検討した。

5) 統計解析:

統計解析としては, 2群間の差の検定には Mann-Whitney U を, 3群間の差の検定には Kruskal-Wallis test の後に多重比較を行った (Scheffe 法)。二変量の相関検定には回帰分析を用いた。群間での分布差の検定には χ^2 検定を用いた。危険率5%未満を有意水準とした。

成績

Group I, Group II, Group III の3群における血清脂質, リポ蛋白, アポリポ蛋白, RLP-C の値を Table 2 に示す。Group II の血清 TC, apo B 値は Group I より高値であったが, Group I と Group III との間に有意差はなかった。血清 TG, HDL-C や apo B 以外のアポリポ蛋白の値は3群間に有意差を見いだせなかった。血清 LDL-C 値, LDL-C/HDL-C 比, apo B/apo AI 比 (それぞれ p<0.001, p<0.01, p<0.05) は Group I で他の2群に比べ有意に低かった。さらに LDL-C 値, LDL-C/HDL-C 比, apo B/apo AI 比は CS と正の (それぞれ R=0.198; p=0.013, R=0.250; p=0.002, R=0.231; p=0.006), CI と負の (それぞれ R=0.183; p=0.022,

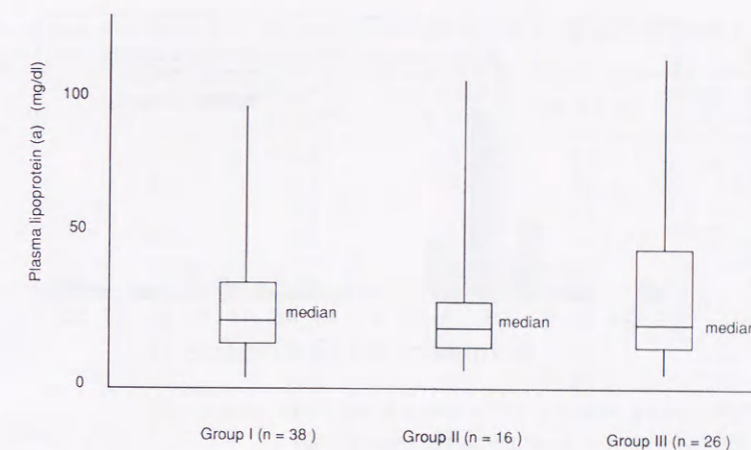


Fig. 2. Plasma Lp(a) concentrations in the Group I, II and III.

The boxes show the median and middle quartiles of the Lp(a) concentrations, while the whiskers represent the lowest and highest quartiles.

Table 3. Allele frequencies in the study populations.

Polymorphisms	Rare allele	Frequency of rare allele
Apo AI/CIII		
<i>Msp</i> I	<i>M</i> ₂ without restriction site	0.481
<i>Sac</i> I	<i>S</i> ₂ with restriction site	0.363
Apo B		
<i>Xba</i> I	<i>X</i> ₂ with restriction site	0.031
Signal peptide	Deletion (Del)	0.194
Apo E genotypes		
	E2	0.071
	E4	0.041

R=0.234; p=0.003, R=0.203; p=0.016) 有意な相関を認めた。血清 RLP-C 値は Group III において他の Group に比べ高い傾向を示したが統計的有意差を認めなかった。血清 Lp(a) 値は3群間で有意差を認めず, その中央値は Group I で26.3 mg/dl, Group II で21.5 mg/dl, Group III で32.1 mg/dl であった (Fig. 2)。また男女の subgroup での検討や, 男性45歳以上, 女性55歳以上の subgroup での検討も行ったが, いずれも有意差はみられなかった。年齢, BMI, 血圧, 喫煙・アルコールの嗜好においても, Group I, Group II, Group III の3群間での有意差はみられなかった。

6つの遺伝子多型の allele 頻度を Table 3 と Fig. 3 に示す。apo B *Xba* I, SP 多型では他と異なった allele 頻度を示し, それぞれ *X*₂*X*₂ genotype, D/D

genotype を認めなかった。Table 4 に年齢, BMI, 血清脂質項目値の proportion of variance を示す。年齢, BMI では脂質動態の proportion of variance は説明できなかった。Apo AI/CIII/AIV 遺伝子多型では *Sac* I RFLP の *S*₂ allele で有意な RLP-C 高値を示したが, 他の脂質関連項目との関連を認めなかった。apo B 遺伝子多型において *Xba* I 多型と血清脂質項目との関連はみられなかった。女性の subgroup でのみ apo B SP 多型と血清 apo B 値, apo B/apo AI 比との関連が認められた (Table 4(c), Table 5)。apo B VNTR 多型と血清脂質項目との関連は認められなかった。E4 カテゴリーは E3 カテゴリーに比し血清 LDL-C 値, LDL-C/HDL-C 比, apo B/apo AI 比が有意に高値を示した (Table 5)。

Group I, Group II, Group III の3群間では apo AI/

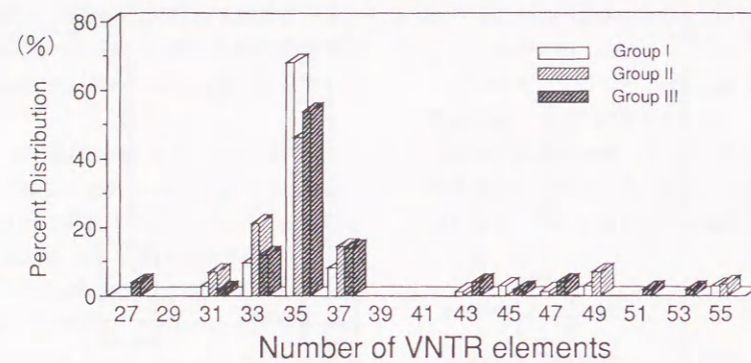


Fig. 3. Frequency distribution of apo B VNTR alleles in the study populations. The most frequent allele is with 35 repeat unit in the three groups. Alleles with 39 and 41 repeat units show a clear nadir.

Table 4(a). Proportion of variance ($R^2 \times 100$) of each trait attributable to age and BMI and to apo AI/CIII/AIV, apo B and apo E gene polymorphisms in the study populations.

Trait	Age and BMI	Apo AI/CIII/AIV <i>Msp</i> I	Apo AI/CIII/AIV <i>Sac</i> I	Apo B <i>Xba</i> I	Apo B Signal peptide	Apo E genotype
Total chol	6.3	1.4	0.2	2.6	0.1	9.0*
Triglycerides	3.2	0.02	1.0	0.8	0.1	0.5
HDL-C	2.3	0.01	0.1	0.1	0.8	1.2
LDL-C	7.8	1.4	0.1	2.0	0.1	16.0*
LDL-C/HDL-C	2.6	1.0	0.3	0.8	0.4	10.9*
Apo AI	1.0	0.1	0.4	0.1	2.6	5.3
Apo B	2.3	0.8	0.4	5.8	0.1	1.4
Apo CIII	2.6	0.1	0.8	0.2	0.8	0.1
Apo E	1.4	2.0	1.2	0.3	0.1	1.2
Apo B/Apo AI	1.2	0.6	0.4	4.0	1.0	2.9
Lp(a)	3.2	1.2	0.4	1.7	0.4	4.4
RLP-C	0.1	17.6	59.3**	7.8	3.2	0.1

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Table 4(b). Proportion of variance ($R^2 \times 100$) of each trait attributable to age and BMI and to apo AI/CIII/AIV, apo B and apo E gene polymorphisms in the male study populations.

Trait	Age and BMI	Apo AI/CIII/AIV <i>Msp</i> I	Apo AI/CIII/AIV <i>Sac</i> I	Apo B <i>Xba</i> I	Apo B Signal peptide	Apo E genotype
Total chol	9.6	1.7	3.2	6.3	3.2	1.7
Triglycerides	21.2*	0.1	2.3	5.3	4.8	0.2
HDL-C	3.6	0.3	5.8	0.4	1.4	2.6
LDL-C	12.9	2.3	0.4	2.9	1.4	4.4
LDL-C/HDL-C	11.5*	1.0	2.3	2.9	1.7	2.9
Apo AI	14.4	0.1	2.0	0.6	0.1	7.8
Apo B	6.8	0.6	2.0	14.4	7.8	3.6
Apo CIII	11.5	0.2	3.6	2.0	9.0	0.5
Apo E	22.1*	0.3	1.4	0.6	5.3	2.6
Apo B/Apo AI	9.0	0.2	0.1	13.0	2.3	6.8
Lp(a)	12.2	1.7	0.1	3.2	5.8	2.6
RLP-C	0.1	12.3	54.8*	16.8	40.9	4.8

* $p < 0.05$

Table 4(c). Proportion of variance ($R^2 \times 100$) of each trait attributable to age and BMI and to apo AI/CIII/AIV, apo B and apo E gene polymorphisms in the female study populations.

Trait	Age and BMI	Apo AI/CIII/AIV <i>Msp</i> I	Apo AI/CIII/AIV <i>Sac</i> I	Apo B <i>Xba</i> I	Apo B Signal peptide	Apo E genotype
Total chol	14.4	1.7	0.2	0.8	3.6	0.6
Triglycerides	1.9	0.3	0.1	1.0	5.8	1.4
HDL-C	7.8	0.3	1.7	0.1	3.2	0.2
LDL-C	10.2	0.8	0.1	1.4	3.2	2.0
LDL-C/HDL-C	3.6	1.2	0.8	0.1	6.8	0.6
Apo AI	4.4	0.1	4.0	0.5	8.4	2.9
Apo B	6.8	1.0	0.1	0.5	10.2*	0.5
Apo CIII	3.6	0.5	0.1	0.6	2.3	0.2
Apo E	12.3	4.8	0.6	4.0	4.4	0.3
Apo B/Apo AI	1.7	1.4	1.0	0.1	16.8*	1.0
Lp(a)	4.0	1.4	4.4	1.0	0.1	10.2
RLP-C	0.1	43.6	70.6	0.1	34.8	4.4

* $p < 0.05$

Table 5. Mean lipid levels (\pm SD) for apo AI/CIII/AIV, apo B and apo E polymorphism that are statistically significant in the study population.

Trait	Apo AI/CIII/AIV <i>Sac</i> I RFLP (No.)			P from Kruskal-Wallis test
	<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₁ (36)	<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₂ (30)	<i>S</i> ₂ <i>S</i> ₂ (14)	
RLP-C (mg/dl)	3.4 \pm 1.7	4.8 \pm 2.7 ^{a)}	7.4 \pm 5.1 ^{b)}	0.0448
apo B (mg/dl)	Apo B genotype (No.)			P from Mann-Whitney U test
	Signal peptide polymorphism in a female subgroup			
	<i>I</i> / <i>I</i> (17)		<i>I</i> / <i>D</i> (15)	
	137 \pm 34.5		131 \pm 41.1	0.027
apo B/apo AI	1.11 \pm 0.33		0.84 \pm 0.3	0.0167
LDL-C (mg/dl)	Apo E categories (No.)			P from Kruskal-Wallis test
	<i>E</i> 2(14)	<i>E</i> 3(59)	<i>E</i> 4(7)	
	96.33 \pm 16.65	133.3 \pm 42.8 ^{c)}	171.0 \pm 59.2 ^{c)}	
LDL-C/HDL-C	2.23 \pm 0.93	3.66 \pm 1.71 ^{d)}	5.54 \pm 3.62 ^{e)}	0.0014
apo B/apo AI	0.77 \pm 0.21	1.01 \pm 0.33 ^{d)}	1.31 \pm 0.52 ^{e)}	0.0043

a) Significantly different from *S*₁*S*₁ genotype at $p < 0.05$

b) Significantly different from *S*₁*S*₁ genotype at $p < 0.01$

c) Significantly different from *E*2 category at $p < 0.01$

d) Significantly different from *E*2 category at $p < 0.05$

e) Significantly different from *E*3 category at $p < 0.05$

CIII/AIV, apo B, apo E 遺伝子多型の genotype や allele 頻度の差は見いだせなかった。アポリポ蛋白遺伝子多型と冠動脈病変重症度との検討では、女性の subgroup において apo B SP 多型と冠動脈病変重症度との関連が認められた。Fig. 4 に apo B SP 多型の genotype 別の CS, CI を box plot で示す。*I*/*I* genotype において有意に CS は高値, CI は低値を示した。55歳以上の閉経女性における検討でも同様な結果が得られた。apo B SP 多型以外のアポリポ蛋白遺伝

子多型と CS, CI との関連は認められなかった。

考 察

アポリポ蛋白遺伝子多型と脂質動態・冠動脈疾患罹患率との関連について Caucasion では多くの研究がなされているにも関わらず、日本人を対象とした研究は少ない。Aburatani ら²⁾は日本人を対象として apo B 遺伝子の2つの RFLP について報告しているが、遺伝子多型と高脂血症との関連は示しておらず、また

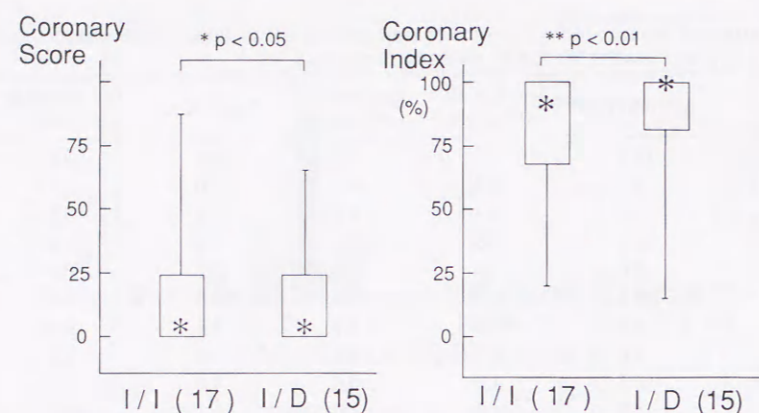


Fig. 4. Box plot showing the distribution of coronary scores and coronary index for coronary atherosclerosis for each of the two genotypes of the apo B signal peptide polymorphism: II and ID. Score and Index are given on the vertical axis and genotype on the horizontal axis. Numbers in brackets denote number of individual with that genotypes. *=median

冠動脈疾患との関連についての検討はされていない。さらに Apo B 遺伝子の有用な marker である多型や VNTR 多型についての日本人を対象とした報告は殆どない。それゆえ我々は本研究において Apo B 遺伝子 SP 多型・VNTR 多型を含めアポリポ蛋白遺伝子多型について冠動脈重症度と関連させて検討した。

本研究において, ApoAI/III/AIV 遺伝子多型は, SacI RFLP の S₂ allele において有意な RLP-C 高値を示した。SacI RFLP については rare allele である S₂ allele と血清 TG 高値・HDL-C 低値との関連が報告されている⁵⁴⁾。RLP-C 高値は TG-rich リポ蛋白の異化障害を反映するものであり, 本研究で見いだされた S₂ allele での RLP-C 高値は, 従来の報告に一致する TG 異化障害を反映した所見と考えた。血清 Apo AI 値は血清 Apo B 値に比べ冠動脈疾患と弱い相関しか示さないことが報告されている⁵⁵⁾。本研究での血清 HDL-C 値・Apo AI 値あるいは ApoAI/III/AIV 遺伝子多型が冠動脈重症度と有意な関連を示さなかったことと関係しているかもしれない。

Apo B 遺伝子多型については広く研究されている。本研究での apo B Xba I RFLP の allele 頻度は Aburatani らの報告²⁾と類似しており Caucasian での報告^{7,52)}と極めて異なる頻度分布であった。SP 多型と VNTR 多型については Caucasian での分布と類似していた。apo B VNTR 多型と血清脂質項目との関連は, Helio らの報告²¹⁾と同様, 認められなかった。Marshall ら³⁸⁾は北ヨーロッパ系の対象にて Apo

AI/III/AIV, apo B, apo E 遺伝子の主な多型と冠動脈造影検査上評価した冠動脈疾患との相関について否定的な見解を述べている。しかしながら, 本研究で検討した冠動脈重症度の評価はされておらず, 冠動脈造影検査所見により分類された群間での Association study であった。さらに彼らの研究は cross-sectional であったことから, アポリポ蛋白遺伝子多型が冠動脈疾患の mass screening や一次予防には適していないと結論しており, アポリポ蛋白遺伝子多型と冠動脈疾患重症度や病変進展との関連については評価していない。

本研究では, 女性では Apo B 遺伝子 SP 多型の II genotype において血清 apo B, apo B/apo AI 比が高値を示すとともに冠動脈病変が重症であることが示された。Peacock らは Caucasian において II genotype での冠動脈硬化の進展を示している⁴⁷⁾。Apo B 遺伝子 SP 多型は機能的な SP 遺伝子上に存在する。すなわち新しく合成された apo B の小胞体への転送効率と, さらに細胞から血中への apo B 分泌効率と関連を示唆されている多型である⁹⁾。本研究において, apo B 遺伝子 SP 多型と冠動脈病変重症度との有意な関連は閉経後女性である55才以上の女性の subgroup においても認められた。Arca ら⁴⁾は閉経後の高コレステロール血症発症患者において LDL 異化の低下とともに LDL 合成の亢進状態を示している。本研究における apo B 遺伝子 SP 多型と血清 LDL-C 高値との有意な関連は, 閉経後高コレステロール血症の機序とし

て女性ホルモンの低下に伴う LDL 異化の低下のみならず遺伝的に規定された LDL 合成の亢進状態が関連していることを示唆している。また apo B 遺伝子 SP 多型と冠動脈病変重症度との有意な関連は, apo B 遺伝子 signal peptide 多型が閉経後女性における冠動脈疾患の一次予防に有用な指標となりうる可能性を示唆しているものと推論した。

Apo E 遺伝子多型の allele 頻度は, 日本人を対象とした Tukamoto らの報告⁵³⁾と類似していた。また E4 カテゴリーにおいて血清 LDL-C 高値を認め apo E 遺伝子の血清脂質動態への関与が示された。

結論として, apo B 遺伝子 SP 多型と血清 apo B 値・冠動脈病変重症度との関連を閉経後女性において見いだした。SP 多型の II genotype は日本人女性において“atherogenic”な genotype である可能性が示された。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 御指導と御校閲を賜りました広島大学医学部内科学第一講座教授梶山悟朗先生に深甚なる謝意を表わします。また本研究を直接御指導いただきました広島大学医学部内科学第一講座講師林幸三先生ならびに動脈硬化研究室の諸先生方に深く感謝の意を表わします。

参 考 文 献

1. Abe, A. and Noma, A. 1988. Enzyme-linked immunosorbent assay of lipoprotein(a) in serum and cord blood. Clin. Chim. Acta 177: 31-40.
2. Aburatani, H., Matsumoto, A., Itoh, H., Yamada, N., Murase, T., Takaku, F. and Itakura, H. 1988. A study of DNA polymorphism in the apolipoprotein B gene in a Japanese population. Atherosclerosis 72: 71-76.
3. Aburatani, H., Matsumoto, A., Itoh, H., Murase, T., Takaku, F. and Itakura, H. 1988. Deoxyribonucleic acid (DNA) polymorphism in the apolipoprotein AI gene: a study in a Japanese population. Jpn. J. Med. 27: 56-59.
4. Arca, M., Vega, G. L. and Grundy, S. M. 1994. Hypercholesterolemia in postmenopausal women. Metabolic defects and response to low-dose lovastatin. JAMA. 271: 453-459.
5. Austen, G. W., Edwards, J. E., Frye, R. L., Gensini, G. G., Gott, V. L., Griffith, L. S. C., McGoan, D. C., Murphy, M. L. and Roe, B. B. 1975. A reporting system on patients evaluated for coronary artery disease. Circulation Suppl. 51: 5-40.

6. Balcon, R., Cattell, M. R., Stone, D. L. and Fuerlicht, G. 1978. A computer generated index for the assessment of coronary angiography. Acta Med. Scand. Suppl. 615: 25-31.
7. Berg, K. 1986. DNA polymorphism at the apolipoprotein B locus is associated with lipoprotein level. Clin. Genet. 30: 515-520.
8. Blackhart, B. D., Ludwig, E. M., Pierotti, V. R., Caiati, L., Onasch, M. A., Wallis, S. C., Powell, L., Pease, R., Knott, T. J., Chu, M. L., Marley, R. W., Scott, J., McCarthy, B. J. and Levy-Wilson, B. 1986. Structure of the human apolipoprotein B gene. J. Biol. Chem. 261: 15364-15367.
9. Boerwinkle, E. and Chan, L. 1989. A three codon insertion/deletion polymorphism in the signal peptide region of the human apolipoprotein B (APOB) gene directly typed by the polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res. 17: 4003.
10. Boerwinkle, E., Xiong, W. J., Fourest, E. and Chan, L. 1989. Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 86: 212-216.
11. Boerwinkle, E., Lee, S. S., Butler, R., Schumaker, V. N. and Chan, L. 1990. Rapid typing of apolipoprotein B DNA polymorphisms by DNA amplification. Association between Ag epitopes of human apolipoprotein B-100, a signal peptide insertion/deletion polymorphism, and a 3' flanking DNA variable number of tandem repeats polymorphism of the apolipoprotein B gene. Atherosclerosis 81: 225-232.
12. Brown, M. S. and Goldstein, J. L. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232: 34-47.
13. Brown, M. S. and Goldstein, J. L. 1983. Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. J. Clin. Invest. 72: 743-747.
14. Davignon, J., Gregg, R. E. and Sing, C. F. 1988. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. Arteriosclerosis 8: 1-21.
15. Friedewald, W. T., Levy, R. I. and Fredrikson, D. S. 1972. Estimation of the concentration of low-density-lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin. Chem. 18: 499-502.
16. Friedl, W., Ludwig, E. H., Paulweber, B., Sandhofer, F. and McCarthy, B. J. 1990. Hypervariability in a minisatellite 3' of the apolipoprotein B gene in patients with coronary heart disease compared with normal controls. J. Lipid

- Res. 31: 659-665.
17. **Friedlander, Y., Kaufmann, N. A., Cedar, H., Weinberg, N. and Kark, J. D.** 1993. The role of XbaI polymorphism of the apolipoprotein B gene in determining levels and covariability of lipid and lipoprotein variables in a sample of Israeli offspring with family history of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 98: 165-177.
 18. **Genest, J. J. Jr., Ordovas, J. M., McNamara, J. R., Robbins, A. M., Meade, T., Cohn, S. D., Salem, D. N., Wilson, P. W., Masharani, U., Frossard, P. M. and Schaefer, E.J.** 1990. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene in patients with premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 82: 7-17.
 19. **Hamsten, A., Walldius, G., Szamosi, A., Dahlen, G. and de Faire, U.** 1986. Relationship of angiographically defined coronary artery disease to serum lipoproteins and apolipoproteins in young survivors of myocardial infarction. *Circulation* 73: 1097-1110.
 20. **Hegele, R. A., Huang, L. S., Herbert, P. N., Blum, C. B., Buring, J. E., Hennekens, C. H. and Breslow, J. L.** 1986. Apolipoprotein B-gene DNA polymorphisms associated with myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 315: 1509-1515.
 21. **Helio, T., Palotie, A., Totterman, K. J., Ott, J., Kauppinen-Makelin, R. and Tikkanen, M. J.** 1992. Lack of association between the apolipoprotein B gene 3' hypervariable region alleles and coronary artery disease in Finnish patients with angiographically documented coronary artery disease. *J. Intern. Med.* 231: 49-57.
 22. **Humphries, S. E.** 1988. DNA polymorphisms of the apolipoprotein genes-their use in the investigation of the genetic component of hyperlipidaemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 72: 89-108.
 23. **Hussain, M. M., Maxfield, F. R., Mas-Oliva, J., Tabas, I., Ji, Z. S., Innerarity, T. L. and Mahley, R. W.** 1991. Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J. Biol. Chem.* 266: 13936-13940.
 24. **Ikeda, T., Shibuya, Y., Senda, U., Sugiuchi, H., Araki, S., Uji, Y. and Okabe, H.** 1991. Automated immunoturbidimetric analysis of six plasma apolipoproteins: Correlation with radial immunodiffusion assays. *J. Clin. Lab. Ana.* 5: 90-95.
 25. **James, R. W., Boemi, M., Giansanti, R., Fumelli, P. and Pometta, D.** 1993. Underexpression of the apolipoprotein E4 isoform in an Italian population. *Arterioscler. Thromb.* 13: 1456-1459.
 26. **Jenkins, P. J., Harper, R. W. and Nestel, P. J.** 1978. Severity of coronary atherosclerosis related to lipoprotein concentration. *Br. Med. J.* 2: 388-391.
 27. **Kamboh, M. I., Ferrell, R. E. and Kottke, B.** 1988. Genetic studies of human apolipoproteins. V. A novel rapid procedure to screen apolipoprotein E polymorphism. *J. Lipid Res.* 29: 1535-1543.
 28. **Kambo, M. I., Aston, C. E., Ferrell, R. E. and Hamman, R. F.** 1993. Impact of apolipoprotein E polymorphism in determining interindividual variation in total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol in Hispanics and non-Hispanic whites. *Atherosclerosis* 98: 201-211.
 29. **Karathanasis, S. K.** 1985. Apolipoprotein multi-gene family: tandem organization of human apolipoprotein AI, CIII, and AIV genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 82: 6374-6378.
 30. **Katzel, L. I., Fleg, J. L., Paidi, M., Ragoobarsingh, N. and Goldberg, A. P.** 1993. ApoE4 polymorphism increases the risk for exercise-induced silent myocardial ischemia in older men. *Arterioscler. Thromb.* 13: 1495-1500.
 31. **Kervinen, K., Savolainen, M. J., Salokannel, J., Hynninen, A., Heikkinen, J., Ehnholm, C., Koistinen, M. J. and Kesaniemi, Y. A.** 1994. Apolipoprotein E and B polymorphisms-longevity factors assessed in nonagenarians. *Atherosclerosis* 105: 89-95.
 32. **Knott, T. J., Wallis, S. C., Pease, R. J., Powell, L. M. and Scott, J.** 1986. A hypervariable region 3' to the human apolipoprotein B gene. *Nucleic Acids Res.* 14: 9215-9216.
 33. **Kuusi, T., Nieminen, M. S., Ehnholm, C., Yki-Jarvinen, H., Valle, M., Nikkila, E. A. and Taskinen, M. R.** 1989. Apoprotein E polymorphism and coronary artery disease. Increased prevalence of apolipoprotein E-4 in angiographically verified coronary patients. *Arteriosclerosis* 9: 237-241.
 34. **Law, A., Wallis, S. C., Powell, L. M., Pease, R. J., Brunt, H., Priestley, L. M., Knott, T. J., Scott, J., Altman, D. G., Miller, G. J., Rajput, J. and Miller, N.E.** 1986. Common DNA polymorphism within coding sequence of apolipoprotein B gene associated with altered lipid levels. *Lancet* 1: 1301-1303.
 35. **Law, S. W., Grant, S. M., Higuchi, K., Hospattankar, A., Lackner, K., Lee, N. and Brewer, H. B. Jr.** 1986. Human liver apolipoprotein B-100 cDNA: complete nucleic acid and derived amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 83: 8142-8146.
 36. **Ludwig, E. H., Friedl, W. and McCarthy, B. J.** 1989. High-resolution analysis of a hypervariable region in the human apolipoprotein B gene. *Am. J. Hum. Genet.* 45: 458-464.
 37. **Lusis, A. J.** 1988. Genetic factors affecting blood lipoproteins: the candidate gene approach. *J. Lipid Res.* 29: 397-429.
 38. **Marshall, H. W., Morrison, L. C., Wu, L. L., Anderson, J. L., Corneli, P. S., Stauffer, D. M., Allen, A., Karagounis, L. A. and Ward, R. H.** 1994. Apolipoprotein polymorphisms fail to define risk of coronary artery disease. Results of a prospective, angiographically controlled study. *Circulation* 89: 567-577.
 39. **Miller, S. A., Dykes, D. D. and Polesky, H. F.** 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.
 40. **Monsalve, M. V., Young, R., Jobsis, J., Wiseman, S. A., Dhamu, S., Powell, J. T., Greenhalgh, R. M. and Humphries, S. E.** 1988. DNA polymorphisms of the gene for apolipoprotein B in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 70: 123-129.
 41. **Myant, N. B., Gallagher, J., Barbir, M., Thompson, G. R., Wile, D. and Humphries, S. E.** 1989. Restriction fragment length polymorphisms in the apo B gene in relation to coronary artery disease. *Atherosclerosis* 77: 193-201.
 42. **Nakajima, K., Saito, T., Tamura, A., Suzuki, M., Nakano, T., Adachi, M., Tanaka, A., Tada, N., Nakamura, H., Campos, E. and Havel, R. J.** 1993. Cholesterol in remnant-like lipoproteins in human serum using monoclonal anti B-100 and apo A-I immunofluorescence mixed gels. *Clin. Chim. Acta* 223: 53-71.
 43. **Nieminen, M. S., Mattila, K. J., Aalto-Setälä, K., Kuusi, T., Kontula, K., Kauppinen-Makelin, R., Ehnholm, C., Jauhiainen, M., Valle, M. and Taskinen, M. R.** 1992. Lipoproteins and their genetic variation in subjects with and without angiographically verified coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb.* 12: 58-69.
 44. **Olofsson, S. O., Bjursell, G., Bostrom, K., Carlsson, P., Elovson, J., Protter, A. A., Reuben, M. A. and Bondjers, G.** 1987. Apolipoprotein B: structure, biosynthesis and role in the lipoprotein assembly process. *Atherosclerosis* 68: 1-17.
 45. **Ordovas, J. M., Civeira, F., Genest, J. Jr, Craig, S., Robbins, A. H., Meade, T., Pocovi, M., Frossard, P. M., Masharani, U., Wilson, P. W.F., Salem, D.N., Ward, R.H. and Schaefer, E.J.** 1991. Restriction fragment length polymorphisms of the apolipoprotein A-I, C-III, A-IV gene locus. Relationships with lipids, apolipoproteins, and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 87: 75-86.
 46. **Paulweber, B., Friedl, W., Krempler, F., Humphries, S. E. and Sandhofer, F.** 1990. Association of DNA polymorphism at the apolipoprotein B gene locus with coronary heart disease and serum very low density lipoprotein levels. *Arteriosclerosis* 10: 17-24.
 47. **Peacock, R., Dunning, A., Hamsten, A., Tornvall, P., Humphries, S. and Talmud, P.** 1992. Apolipoprotein B gene polymorphisms, lipoproteins and coronary atherosclerosis: a study of young myocardial infarction survivors and healthy population-based individuals. *Atherosclerosis* 92: 151-164.
 48. **Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
 49. **Shoulders, C. C., Myant, N. B., Sidoli, A., Rodriguez, J. C., Cortese, C., Baralle, F. E. and Cortese, R.** 1985. Molecular cloning of human LDL apolipoprotein B cDNA. Evidence for more than one gene per haploid genome. *Atherosclerosis* 58: 277-289.
 50. **Simpson, H. C., Mann, J. I., Meade, T. W., Chakrabarti, R., Stirling, Y., and Woolf, L.** 1983. Hypertriglyceridaemia and hypercoagulability. *Lancet* 1: 786-790.
 51. **Stampfer, M. J., Sacks, F. M., Salvini, S., Willett, W. C. and Hennekens, C. H.** 1991. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 325: 373-381.
 52. **Talmud, P. J., Barni, N., Kessling, A. M., Carlsson, P., Darnfors, C., Bjursell, G., Galton, D., Wynn, V., Kirk, H., Hayden, M. R. and Humphries, S.E.** 1987. Apolipoprotein B gene variants are involved in the determination of serum cholesterol levels: a study in normo- and hyperlipidaemic individuals. *Atherosclerosis* 67: 81-89.
 53. **Tsukamoto, K., Watanabe, T., Matsushima, T., Kinoshita, M., Kato, H., Hashimoto, Y., Kurokawa, K. and Teramoto, T.** 1993. Determination by PCR-RFLP of apo E genotype in a Japanese population. *J. Lab. Clin. Med.* 121: 598-602.
 54. **Tybjærg-Hansen, A., Nordestgaard, B. G., Gerdes, L. U., Faergeman, O. and Humphries, S. E.** 1993. Genetic markers in the apo A1-CIII-AIV gene cluster for combined hyperlipidemia,

- hypertriglyceridemia, and predisposition to atherosclerosis. *Atherosclerosis* 100: 157-169.
55. **Utermann, G.** 1987. Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. *Am. Heart J.* 113: 433-440.
56. **Xu, C. F., Tikkanen, M. J., Huttunen, J. K., Pietinen, P., Butler, R., Humphries, S. and Talmud, P.** 1990. Apolipoprotein B signal peptide insertion/deletion polymorphism is associated with Ag epitopes and involved in the determination of serum triglyceride levels. *J. Lipid Res.* 31: 1255-1261.

The Association between Apolipoprotein Polymorphisms and Severity of Coronary Atherosclerosis in Japanese Patients with Angiographically Documented Coronary Artery Disease

Yoshifumi OKURA

The First Department of Internal Medicine, Hiroshima University School of Medicine
(Director: Prof. Goro KAJIYAMA)

To assess the impact of apolipoprotein gene polymorphisms on serum lipid traits and severity of coronary atherosclerosis in Japanese populations, apolipoprotein gene polymorphisms were investigated at the following loci: apo A/CIII/AIV (two restriction site polymorphisms - *Msp* I and *Sac* I), apo B (*Xba* I polymorphism, an insertion/deletion [I/D] polymorphism in the signal peptide [SP] region, and variable number of tandem repeat [VNTR] polymorphism of the 3' hypervariable region) and apo E (ϵ 2, ϵ 3 and ϵ 4) in 80 Japanese subjects (48 men and 32 women, mean age 57.1 years old) undergoing coronary angiography. Severity of coronary atherosclerosis was found to be significantly associated with LDL-C, LDL-C/HDL-C and apo B/apo AI levels. There were significant association of serum lipid traits with genetic polymorphisms; high serum RLP-C level in S 2 allele of *Sac* I restriction fragment length polymorphism, high levels of apo B and apo B/apo AI in I/I genotype of the apo B SP polymorphism in a female subgroup, high levels of LDL-C, LDL-C/HDL-C and apo B/apo AI in E4 category (ϵ 3/4 and ϵ 4/4). I/I genotype of the apo B SP polymorphism revealed a significant association with severity of atherosclerosis in a female subgroup.

These findings estimated that I/D SP polymorphism at the apo B gene locus is associated with the lipid traits, which may be the postmenopausal hypercholesterolemia, as well as the subsequent development of atherosclerosis in the female Japanese populations.