

学位論文題名

β 2-glycoprotein I deficiency : prevalence,
genetic background and effects on plasma
lipoprotein metabolism and hemostasis

(β 2 グリコプロテイン I 欠損 : その頻度, 遺伝的背景,
脂質代謝および凝固系に与える影響)

学位論文内容の要旨

β 2 グリコプロテイン I (β 2-glycoprotein I: β 2GPI = apolipoprotein H) は, 分子量約 50kD, 5つの繰り返し構造 (ドメイン I-V) から形成されるリン脂質結合性のアポリポ蛋白である。血栓症と習慣流産を主症状とする自己免疫疾患である抗リン脂質抗体症候群において, β 2GPI は重要な自己抗原であることが知られている。 β 2GPIは, その約30%がリポ蛋白分画に存在し, 生理的には主に脂質代謝に関与すると考えられている。リポ蛋白リパーゼの活性化や血中からのトリグリセリド除去作用, 酸化 LDL と結合することによってマクロファージによる酸化 LDL の貪食を抑制するといった抗動脈硬化作用が知られている。また, 凝固線溶系に対しては, リン脂質依存性の凝固反応や血小板凝集を抑制するといった anticoagulant としての側面と, 陰性荷電リン脂質上でプロテイン C 系を抑制するといった procoagulant な性質を合わせもつと考えられているが, 依然不明な点も多い。

我々は β 2GPI の生体内での機能をよりよく理解するために, 固相酵素抗体法を用いた血清中 β 2GPI 濃度の測定系を確立し, 北海道地区在住で自覚症状を持たない812名の血清中 β 2GPI 濃度を測定した。測定した812名の血清中 β 2GPI 濃度は $236 \pm 104 \mu\text{g/dl}$ であったが, うち2名は測定感度以下であり, 完全欠損者であると考えられた。 β 2GPI 欠損の遺伝的背景を明らかにするために, 欠損者末梢血より DNA を抽出し, β 2GPI のゲノム DNA を構成する8つのエクソンを PCR 法により増幅し, DNA 配列を決定した。結果, β 2GPI 欠損者では β 2GPI DNA の第4エクソン内, cDNA の 379番目にあたる thymine が欠失し, frame shift を生じていることが明らかになった。さらに, 第6エクソン内に停止コドンが出現していた。 β 2GPI 欠損者は両者とも同様のホモ遺伝子変異を有しており, 第一発端者の家系では, 同胞1名がホモ欠損, 母親はヘテロ欠損であり糖尿病に罹患, 父親は脳卒中にて61歳時に死亡しており遺伝子の検討は行えなかった。第一発端者, その同胞1名および母親はいずれも喫煙者, 第一発端者およびその同胞は健康であった。発端者と母親には肥満を認めた。血清総コレステロール, 中性脂肪, HDL-コレステロール, LDL-コレステロール, apoAI, apoAII, apoB, apoCII, apoCIII, apoE, Lp(a), コレステリルエステル転送蛋白濃度について検討したところ, 発端者の同胞と母親では総コレステロール, LDL-コレステロールおよび apoB の増加を伴う顕著な高脂血症を呈していた。native PAGE にて LDL の低分子化を伴っており, IIb型家族性高脂血症に類似した変化であった。発端者の同胞では軽度の高脂血症を認めるのみであった。アガロース電気泳動では, 3名ともに pre- β バンドを認めた。第二発端者の家系

調査では、発端者は健常、母親がヘテロ欠損であり高血圧に罹患、父親は42歳時に死亡、原因不明であった。第二発端者および母親には肥満を認めず、高脂血症、LDLの低分子化、pre- β バンドともに認められなかった。また、ホモ欠損者計3名において、一般凝固系検査には異常を認めなかった。

次に、Thymine379欠失による β 2GPI欠損の頻度を検討する目的で、制限酵素ApaL1を用いたPCR-RFLP法を確立した。正常血圧、肥満、腎障害、糖尿病および貧血を認めず、喫煙、習慣飲酒のない健常人222名について検討したところ、14名(6.3%)がヘテロ欠損者であった。ホモ欠損者は認めなかった。血清 β 2GPI濃度は、非欠損者では $243 \pm 99 \mu\text{g/dl}$ であるのに対し、ヘテロ欠損者では $86 \pm 31 \mu\text{g/dl}$ と有意に低値であった(Mann-whitney's U-test, $p < 0.0001$)。総コレステロール、中性脂肪、HDLコレステロール、LDLコレステロール、apoA-1、apoBおよびLp(a)濃度に関しては非欠損者とヘテロ欠損者の間に有意差を認めなかった。

また、白人健常人130名について遺伝子型を検討したところ同様の変異は認めなかった。日本人において、Thymine379の欠失による β 2GPIヘテロ欠損者の頻度は比較的高いが、白人では認められないか、少なくとも極めてまれであると考えられた。

これまでの*in vitro*の検討では、 β 2GPIは脂質代謝あるいは凝固系に関与することが示唆されているが、 β 2GPI欠損家系に関する過去の臨床検討では、明らかな血栓症、出血傾向や脂質代謝異常の直接の原因とはならないとされている。ただし、これらの報告のうちに外傷や手術などのストレス後に血栓症を発症した例がみられること、完全欠損者5名中2名に心筋梗塞を発症していることから、血栓症の二次的な危険因子となる可能性は否定できないと考えられる。

今回の我々の検討では、 β 2GPIホモ欠損者3名の脂質代謝は一樣ではない。第一発端者の家系にみられたsmall LDLの増加を伴う高脂血症は脂質の過酸化や動脈硬化を示唆するものであるが、第二発端者に同様の変化がみられないことから、これらの異常所見が β 2GPI欠損の直接の結果ではない可能性が高く、第一発端者の家系においては、喫煙、肥満、糖尿病などが脂質代謝に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

さらに、脂質代謝に影響を与える因子の多くを排除して、より詳細な検討を試みたが、 β 2GPIヘテロ欠損者では正常人に比較して有意な血清中 β 2GPI濃度の低下を認めた他に脂質代謝への明らかな影響は認められなかった。 β 2GPIがヘテロ欠損者にみられる低濃度でも十分に脂質代謝における作用を果たしうる可能性と、 β 2GPIが脂質代謝にとって重要な役割を持たない可能性が考えられた。

このように、 β 2GPI欠損は、単独では高脂血症や動脈硬化血栓症、あるいは血栓症の主要な危険因子とはならない可能性が高いと考えられるが、これまでに報告された生理的機能や今回の我々の検討から、高脂肪食、肥満、糖尿病、喫煙など、他の危険因子が存在する場合、二次的な危険因子として働くことも考えられる。 β 2GPI欠損が脂質代謝にどのように影響するか、あるいは動脈硬化の危険因子であるか明らかにするためには、より大規模な検討が必要と思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 小 林 邦 彦

学 位 論 文 題 名

β 2-glycoprotein I deficiency : prevalence, genetic background and effects on plasma lipoprotein metabolism and hemostasis

(β 2 グリコプロテイン I 欠損 : その頻度, 遺伝的背景,
脂質代謝および凝固系に与える影響)

β 2-glycoprotein I (β 2GPI = apolipoprotein H) は, 分子量約 50kD, 5つのドメインから成るリン脂質結合性蛋白であり, 血栓症と習慣流産を主症状とする自己免疫疾患である抗リン脂質抗体症候群における重要な自己抗原である。 β 2GPI は, 生理的には主に脂質代謝に関与すると考えられており, リポプロテインリパーゼの活性化や血中からのトリグリセリド除去作用, 酸化 LDL と結合することによる抗動脈硬化作用が知られている。また, 凝固線溶系に対しては, リン脂質依存性の凝固反応や血小板凝集を抑制する anticoagulant としての側面と, プロテイン C 系を抑制する procoagulant な性質をあわせもつと考えられているが, 不明な点も多い。

β 2GPI の機能をより理解するために, 固相酵素抗体法を用い, 自覚症状を持たない日本人812名の血清中 β 2GPI 濃度を測定し, うち2名に完全欠損を認めた。欠損者の DNA 配列を検討したところ, β 2GPI 欠損者では β 2GPI DNA の第4エクソン内, cDNA の 379番目にあたる thymine が欠失し, frame shift を生じていた (β 2GPI Sapporo)。第一家系では, 発端者および同胞1名がホモ欠損, 母親はヘテロ欠損であり糖尿病に罹患, 父親は脳卒中にて61歳時に死亡していた。第一発端者, その同胞1名および母親はいずれも喫煙者であり, 発端者と母親に肥満を認めた。脂質代謝について検討したところ, 発端者の同胞と母親では総コレステロール, LDL-コレステロールおよび apoB の増加を伴う顕著な高脂

血症を呈し、native PAGE にて LDL の低分子化を伴っており、IIb型家族性高脂血症に類似した変化であった。第二家系では、発端者はホモ欠損で健康、母親がヘテロ欠損であり高血圧に罹患、父親は42歳時に死亡していた。発端者および母親には明らかな脂質代謝異常は認めなかった。また、ホモ欠損者計3名の凝固線溶系検査では潜在性血栓症の存在を示唆する所見を認めなかった。

次に、 β_2 GPI Sapporo アレルを検出するための PCR-RFLP 法を確立した。正常血圧、肥満、腎障害、糖尿病および貧血を認めず、喫煙、習慣飲酒のない健常人 222名について検討したところ、6.3% がヘテロ欠損であり、ホモ欠損者は認めなかった。血清 β_2 GPI 濃度は、非欠損者の $243 \pm 99 \mu\text{g/ml}$ に対し、ヘテロ欠損者では $86 \pm 31 \mu\text{g/ml}$ と有意に低値であった。総コレステロール、中性脂肪、HDLコレステロール、LDLコレステロール、apoA-1、apoB および Lp(a) 濃度に関しては非欠損者とヘテロ欠損者の間に有意差を認めず、 β_2 GPI が低濃度でも十分に脂質代謝における作用を果たしうる可能性が考えられた。また、白人健常人131名に β_2 GPI Sapporo 変異は認めなかった。

今回の検討からは β_2 GPI 欠損が高脂血症や血栓症の明らかな危険因子とはいえないが、過去の報告において、 β_2 GPI 欠損家系に高脂血症や血栓症例が存在していたことや、ノックアウトマウスにおいて、高脂肪食負荷で動脈硬化の進展を認めたとの報告があることもあわせ、二次的な危険因子となる可能性も考えられた。

発表終了後、小林教授から、 β_2 GPI を介した抗リン脂質抗体症候群の発症機序、白人に β_2 GPI Sapporo が認められないことの意義、および Lp(a) フェノタイプ、LDL 受容体欠損など他の動脈硬化リスクファクターを除外したかどうかについての質問があった。続いて小池教授から、血栓症集団や高脂血症集団での遺伝学的検討を行ったかとの質問があり、最後に吉木教授から、ホモ欠損者の頻度や家系調査についての質問があり、今後の課題としてより大きな家系調査や、白人における遺伝子異常の検討を行うべきとのコメントがあった。これらの質問に対し、申請者は概ね適切に回答した。

この論文は、 β_2 GPI 欠損の責任遺伝子を初めて明らかにし、その頻度および脂質代謝への影響を検討したとして高く評価され、今後、 β_2 GPI 欠損が動脈硬化の危険因子となりうるか否かを明らかにする意味で、また、人類遺伝学的検討をすすめるうえで基盤になるものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。