

## 牛乳摂取後のpostprandial hyperlipidemia に対して、アポ蛋白E多型が及ぼす影響 の遺伝子学的、代謝学的解析

筑波大学臨床医学系	松	島	照	彦
筑波大学医科学研究科	袴	田	秀	樹
	渡	辺	由	香
筑波大学医学研究科	富	沢	浩	子
東京大学第一内科	塚	本	和	久

### 【序 論】

アポ蛋白Eはリポ蛋白の構成アポ蛋白成分として共通にみられる脂質結合能の他、リポ蛋白リパーゼ、肝性トリグリセリドリパーゼの活性化作用、さらにLDL受容体、及びレムナント受容体への結合能を有し、リポ蛋白代謝上重要な役割を果たしている。特に、アポ蛋白Eはカイロミクロンの残遺体であるカイロミクロンレムナント上に多く存在し、そのレムナント受容体を介しての肝への取り込みを引き起こし、食事性リポ蛋白の代謝を決定している。

アポ蛋白Eはその成熟蛋白が299アミノ酸残基からなる糖蛋白であるが、アミノ酸配列の変化によりいくつかの多型が存在している。すなわち、野生型と考えられるアポ蛋白E 3に対し、その第112番目のアミノ酸残基であるCysがArgに変わった多型がアポ蛋白E 4であり、158番目のArgがCysに変わったものがアポ蛋白E 2である。いずれも荷電アミノ酸の変異であるので、蛋白の等電点の変化をきたし、アポ蛋白E 4は塩基性の、アポ蛋白E 2はより酸性の性格を有している。この多型は遺伝的に決定され、遺伝子上の塩基の変異によるものであることが知られており、本邦ではアポ蛋白E 2、E 4の対立遺伝子 $\epsilon$  2、 $\epsilon$  4はそれぞれ遺伝子頻度として約10%、5%程度で存在していると考えられている。現在、アポ蛋白Eには他にも異なる等電点、アミノ酸配列を有する稀な変異が発見され、約10種類のイソ蛋白が報告されている。

これらアポ蛋白Eの多型の内、アポ蛋白E 2を有するものの中にはⅢ型高脂血症

を呈するものがあることが知られている。これはその変異の存在する第140から160残基がLDL受容体への結合部位であり、その付近に近い陽性荷電アミノ酸が結合に重要であるので、アポ蛋白E 2は結合能を失い異常リポ蛋白が蓄積するのであろうと考えられている。しかし、Ⅲ型高脂血症を発症しない限りアポ蛋白E 2を有するものはLDLの産生がむしろ悪いために血清コレステロール値はむしろ低いことが知られている。一方、アポ蛋白E 4を有するものは受容体への結合能はアポ蛋白E 3と差がないが、未だ不明の原因よりリポ蛋白の代謝回転が速く、血清コレステロール値はより高値をとることが認められている。

一方、牛乳は高脂肪食品であるが、飲用後および長期飲用を行っても血清脂質、血清コレステロール値の上昇は少ないことが知られ、それには牛乳の非脂肪成分(乳清)の働きが関与している可能性が示唆されている。我々はこの度、この牛乳摂取後の血清脂質の変化がアポ蛋白Eの多型により違いがあるかどうかを知る目的で、食事性リポ蛋白であるカイロミクロンとカイロミクロンの代謝残遺体であるカイロミクロンレムナントの代謝を観察した。レチノールはビタミンAの前駆体であるがそのエステルは経口投与すると非極性脂質としてカイロミクロンの中核部を構成して運搬されるが、トリグリセリドと異なりリポ蛋白リパーゼによる水解を受けないため、カイロミクロンの異化が進行しカイロミクロンレムナントとなって肝臓に取り込まれるまでその粒子上に留まっている。本研究でレチノールパルミテートを牛乳飲用と共に経口負荷してカイロミクロンを体内標識し、レムナントの異化の観察を試みた。

## 【方 法】

### 1. アポ蛋白E多型の分析

23歳から37歳の健常男女30名から抗凝血剤入り容器に採血を行い、白血球層を分離した。白血球を洗浄し、SDS、プロナーゼKにて細胞を溶解後、穏やかにフェノール抽出を行い染色体DNAを得た。既報に従い、第112、146アミノ酸をコードする領域付近をPCR法にて増幅し、①制限酵素Hha Iにて消化後の断片を1%アガロース電気泳動にて分離して断片長を分析し、または②site specific oligonucleotideをプローベとしてドットプロットを行いアポ蛋白Eの遺伝子型を判定した。

アポ蛋白Eの表現型の判定には、全血清、または、血清からHavelらの方法に従い超遠心法により分離したVLDLを用いた。試料を脱脂後、等電点電気泳動法により蛋白を分離し、抗アポ蛋白E抗体を用いたウェスタンブロッティング法によりアポ蛋白Eのイソ蛋白を分析した。

## 2. 牛乳摂取後のカイロミクロンレムナントの代謝と解析

アポ蛋白Eの多型E4/E3 ( $\epsilon 4/\epsilon 3$ )、E3/E3 ( $\epsilon 3/\epsilon 3$ )、E3/E2 ( $\epsilon 3/\epsilon 2$ )型の各3名について、牛乳-レチノール負荷試験を行った。被検者は12時間以上の絶食の後、空腹時採血を行い、3.5%乳脂肪を含む牛乳500ml (脂肪17.5gに相当)とチョコラA6錠 (レチノールパルミテートとして6000単位)を摂取し、以降2時間毎に採血を行った。4時間目の採血の後はレチノール含量の少ない食品に限って摂食を許可した。血液より血清を分離し、超遠心法により20,000rpm×30minの分画をカイロミクロン、40,000rpm×16hrsの分画をカイロミクロンレムナントとした。血清、およびリポ蛋白分画中のコレステロール、中性脂肪濃度は酵素法を用いて測定した。レチノールパルミテート濃度はHPLCを用いて測定した。レチノールの血清中で最高値をとる時を頂値として、その半値にいたる時間をもって、カイロミクロンレムナントの半減期とした。

### 【結果】

アポ蛋白E多型を分析した25名の被検者の内、遺伝子型 $\epsilon 3/\epsilon 4$ 型は5名、 $\epsilon 3/\epsilon 3$ 型は15名、 $\epsilon 2/\epsilon 3$ 型が5名がそれぞれ同定された。血清蛋白のウェスタンブロッティング法により解析したアポ蛋白Eの表現型は全例において遺伝子型と一致していた。このうち、各3名を無作為に選んで牛乳-レチノール負荷試験を行った。

負荷前空腹時の血清脂質の値はコレステロール値は $\epsilon 3/\epsilon 4$ 型、 $\epsilon 3/\epsilon 3$ 型、 $\epsilon 2/\epsilon 3$ 型がそれぞれ平均157.0、139.1、152.3mg/dl、中性脂肪値は同じくそれぞれ72.6、77.0、72.6mg/dlであり何れも3群間で差はなかった。牛乳摂取後2時間の血清中性脂肪値は3群でそれぞれ $88.7 \pm 55.3$ 、 $83.9 \pm 26.3$ 、 $71.6 \pm 37.0$ mg/dlで、何れの群も前値と比べて変化を認めなかった(表1)。牛乳摂取後2時間のカイロミクロ

ン中性脂肪値の摂取前値に対する増加分は、 $\epsilon 3/\epsilon 4$ 型、 $\epsilon 3/\epsilon 3$ 型、 $\epsilon 2/\epsilon 3$ 型でそれぞれ $0.8 \pm 3.3$ 、 $9.5 \pm 6.6$ 、 $6.2 \pm 5.4 \text{mg/dl}$ であり、 $\epsilon 3/\epsilon 4$ 型に低い傾向がみられた。

カイロミクロンレムナント分画のレチノールパルミテート濃度は全例において摂取後6時間目に頂値に達した。レチノール代謝速度より得たカイロミクロンレムナントの半減期は $\epsilon 3/\epsilon 4$ 型、 $\epsilon 3/\epsilon 3$ 型、 $\epsilon 2/\epsilon 3$ 型でそれぞれ $0.39 \pm 0.11$ 、 $0.40 \pm 0.01$ 、 $0.48 \pm 0.10$  (時間) であり、 $\epsilon 2/\epsilon 3$ 型において延長がみられた。(表2、図)

### 【考 察】

レチノールエステルの血中での非水解性を利用して、牛乳-レチノール負荷試験を行った。HPLCを用いたレチノールパルミテートの定量は十分に鋭敏で、典型的な代謝曲線を得ることが出来た。これまでの負荷試験が、大量のレチノールエステルおよび脂肪を摂取し、不快な検査であったのに比し、本法は牛乳の飲用が快適であり、レチノールの摂取量が少ないのでそれによる中毒を起こす危険性が少なく、安全かつ有用性に富む検査法と考えられた。

アポ蛋白Eの遺伝子型(表現型も同じであるが)による牛乳摂取後のカイロミクロン中性脂肪の増加率には差異は無く、アポ蛋白Eの多型は脂肪の腸管からの吸収には大きな影響を与えていないと考えられた。レチノールの血中レベルには被検者により約10倍の開きがありその吸収に差があると考えられたが、アポ蛋白Eの多型との間には一定の関係はみられなかった。

カイロミクロンレムナントの異化速度としての半減期を検討したところ、 $\epsilon 2/\epsilon 3$ 型を有するものは $\epsilon 3/\epsilon 3$ 型、 $\epsilon 3/\epsilon 4$ 型を有するものに比べ半減期の延長がみられた。これは、アポ蛋白E2を有するリポ蛋白粒子が受容体に対する結合能が低く、肝臓に取り込まれるのにより長時間を要するためと考えられる。また、アポ蛋白 $\epsilon 3/\epsilon 4$ 型を有するものには半減期の短いものが多かったが、平均では差がなかった。いずれも例数を増やしての統計学的検討が必要であると考えられた。

牛乳を摂取しても血清中性脂肪値には大きな変化はみられなかったが、摂取されたカイロミクロンレムナントの代謝に牛乳はどのような影響を与えるのであろうか、今

後、純脂肪の摂取を行ってのレチノール負荷試験を行って、牛乳を摂取したときのカイロミクロンレムナントの代謝速度との比較検討を行う必要があると考えられた。カイロミクロンレムナントは中性脂肪に富むカイロミクロンの代謝残遺体であると共にHDLで形成されたコレステロールエステルを転送蛋白 (CETP) を介して受け取り、コレステロールに富んだりポ蛋白粒子である。カイロミクロンレムナントの蓄積した状態がⅢ型高脂血症であり、その予後からもカイロミクロンレムナントは強い動脈硬化惹起性があると考えられている。現在、空腹時血清中性脂肪値それ自体は有意の動脈硬化の危険因子とはならないという風に広く受け入れられているが、食事後に出現するカイロミクロンレムナントの代謝を考えると空腹時のデータのみではリスクを論じることは難しいと考えられる。本研究において、個々の例についてカイロミクロンレムナントの代謝を評価することが出来たが、この意味においてはレムナントの代謝の延長した個体はリスクの大きい群に属すると言うことができる。さらにこのレムナント代謝に及ぼす、牛乳の影響を見ることは大変興味深いと考えられる。

#### 参考文献

- 1) PCR-RFLP法によるアポ蛋白E多型の検討. 塚本和久ら. 動脈硬化 18(11) : 1012, 1990.
- 2) Kinetics of chylomicron remnant clearance in normal and in hyperlipoproteinemic subjects. Jean A. Cortner, et al. J.Lipid Res. 28 : 195, 1987.

表1 牛乳摂取後の血清中性脂肪値の推移  
(mg/dl)

症例	アポE	時間 0	2	4
1		38.4	30.9	79.6
2	$\epsilon$ 2/3	134.2	126.8	153.0
3		42.5	29.8	32.4
4		69.6	78.9	34.7
5	$\epsilon$ 3/3	66.8	45.3	56.6
6		75.5	118.2	136.8
7		140.1	165.3	172.1
8	$\epsilon$ 3/4	73.2	64.0	71.2
9		53.9	36.9	90.9

表2 牛乳摂取後のカイロミクロンレムナント分画  
のレチノールパルミテート濃度の変化 ( $\mu$ g/dl)

症例	アポE	時間 0	2	4	6	8	10	12	t1/2
1		N	N	17.6	24.6	14.2	6.3	2.9	0.59
2	$\epsilon$ 2/3	1.2	1.4	23.6	136.1	50.7	23.9	17.9	0.39
3		N	N	3.4	5.9	2.8	0.9	N	0.47
4		N	N	12.3	29.9	11.1	7.4	4.1	0.39
5	$\epsilon$ 3/3	N	N	5.3	20.3	7.3	4.9	2.7	0.39
6		N	N	27.7	33.1	12.7	5.8	4.1	0.40
7		N	1.1	13.8	35.1	18.3	12.7	8.7	0.52
8	$\epsilon$ 3/4	N	N	7.7	38.3	8.6	5.1	4.1	0.32
9		N	N	12.0	25.0	5.6	4.5	N	0.32

N: 検出感度以下

牛乳摂取後のカイロミクロンレムナント分画の  
レチノールパルミテート濃度の変化

