

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-247263

(P2009-247263A)

(43) 公開日 平成21年10月29日(2009.10.29)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q	1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N	15/00 A	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)		G O 1 N	33/53 M	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 51 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2008-98088 (P2008-98088)</p> <p>(22) 出願日 平成20年4月4日(2008.4.4)</p> <p>特許法第30条第1項適用申請有り 平成19年10月4日 インターネットアドレス「http://www.sciencedirect.com/science/journal/08887543」に発表</p>	<p>(71) 出願人 399077674 G&Gサイエンス株式会社 福島県福島市松川町美郷四丁目1番地の1</p> <p>(71) 出願人 506023806 山田 芳司 三重県津市観音寺町511 観音寺宿舎C-52号</p> <p>(74) 代理人 100108280 弁理士 小林 洋平</p> <p>(72) 発明者 山田 芳司 三重県津市観音寺町511 観音寺宿舎C-52号</p> <p>(72) 発明者 武安 岳史 福島県福島市松川町美郷4-1-1 G&Gサイエンス株式会社内</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 脂質代謝異常の遺伝的リスク検出法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】脂質代謝異常、遺伝的リスクを判断するための一材料を得るための、日本人に適した遺伝子の検出法を提供する。

【解決手段】195個の候補遺伝子に関し258個の遺伝子多型をPCR、配列特異的オリゴヌクレオチドプローブ、およびサスペンション・アレイ・テクノロジー(SAT)を用いて検出し、脂質代謝異常に有意に関連する遺伝子多型を検出する方法。この検出法は、特に日本人の脂質代謝異常の発症予測、およびその予防に有用である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ABCA1の1051G A、ABCB1のT G、ABCC6の3826G A、ABCC8の3857G A、ACAT2の41A G、ADIPOQの62G T、ADIPOR1のC G、AGTの-6G A、AGTR2の3123C A、AKAP10の2073A G、APOA5の-1131T C、-3A G、553G T、APOBのC T、T C、APOC3の1100C T、APOEの4070C T、-219G T、3932T C、CD14の-260C T、CETPの-629C A、C T、CPB2のT C、CYP3A5の6986A G、CYP7A1の-204A C、ENPP1の97A C、EPHX2のG A、FABP2の2445G A、GJA4の1019C T、ITGB2の1323C T、LIPCの-250G A、LPLの1595C G、LTAの804C A、MMP1の-519A G、MTPの-493G T、P2RY12の744T C、PCSK9のA G、PDE4DのTAAA-、C T、PSMA6の-8C G、SERPINE1の6684G 5G、THBDの2136C T、THBS2の3949T G、TNFの-238G A、-850C T、UTS2の347G A、VAMP8のA Gの遺伝子多型と、性別、肥満指数（body mass index：BMI）とを評価因子とし、各評価因子のオッズ比を乗じた発症リスクを計算し、この発症リスクを平均と分散またはパーセント区分に応じて3つ以上の複数の群を作成し、各群に応じて発症のリスクを検出することを特徴とする脂質代謝異常のリスク検出法。

10

20

【請求項2】

脂質代謝異常が高コレステロール血症であり、ABCA1の1051G A、ABCC8の3857G A、AGTの-6G A、APOA5の-1131T C、APOBのT C、APOEの4070C T、3932T C、CD14の-260C T、CETPのC T、ENPP1の97A C、EPHX2のG A、GJA4の1019C T、LIPCの-250G A、LTAの804C A、PDE4DのTAAA-、SERPINE1の6684G 5G、VAMP8のA Gのうちの少なくとも1個または2個以上の遺伝子多型を検出することを特徴とする脂質代謝異常のリスク検出法。

【請求項3】

脂質代謝異常が高トリグリセリド血症であり、ACAT2の41A G、APOA5の-1131T C、553G T、APOC3の1100C T、APOEの3932T C、CYP3A5の6986A G、CYP7A1の-204A C、ITGB2の1323C T、LPLの1595C G、MMP1の-519A G、MTPの-493G T、PCSK9のA G、PDE4DのC T、SERPINE1の6684G 5G、THBDの2136C Tのうちの少なくとも1個または2個以上の遺伝子多型を検出することを特徴とする脂質代謝異常のリスク検出法。

30

【請求項4】

脂質代謝異常が低HDLコレステロール血症であり、ABCB1のT G、ADIPOQの62G T、AGTの-6G A、AGTR2の3123C A、APOA5の-3A G、-1131T C、553G T、APOBのC T、APOEの-219G T、3932T C、CD14の-260C T、CETPの-629C A、LIPCの-250G A、LPLの1595C G、PSMA6の-8C G、SERPINE1の6684G 5G、TNFの-850C T、UTS2の347G Aのうちの少なくとも1個または2個以上の遺伝子多型を検出することを特徴とする脂質代謝異常のリスク検出法。

40

【請求項5】

脂質代謝異常が高LDLコレステロール血症であり、ABCC8の3857G A、ADIPOR1のC G、AGTの-6G A、AGTR2の3123C A、AKAP10の2073A G、APOBのT C、APOEの4070C T、3932T C、CPB2のT C、FABP2の2445G A、LPLの1595C G、P2RY12

50

の744T C、THBS2の3949T G、TNFの-238G Aのうちの少なくとも1個または2個以上の遺伝子多型を検出することを特徴とする脂質代謝異常のリスク検出法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、脂質代謝異常の遺伝的リスク検出法等に関するものである。

【背景技術】

【0002】

脂質代謝異常は、遺伝的要因および環境的要因の相互作用によって起こる多因子性疾患である。環境的要因としては、高脂肪および高カロリーの食事、運動不足などがある（非特許文献1）。遺伝子連鎖解析（非特許文献2-4）および候補遺伝子解析（非特許文献5-8）によって、脂質代謝異常との連鎖が示唆されるいくつかの染色体領域および候補遺伝子が特定されている。しかしながら、脂質代謝異常の遺伝的要因については、未だ十分に解明されていない。更に、ライフスタイルおよび環境要因における集団間の相違と、遺伝的要因を考慮し、各集団において、脂質代謝異常に関連する遺伝子多型を精査することが重要である。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明は、上記の事情に鑑みてなされたものであり、その目的は、脂質代謝異常について、遺伝的リスクを判断するための一材料を得るための遺伝子検出法等を提供することにある。

20

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、脂質代謝異常に関し、5,421人の日本人について、195遺伝子中の258カ所の遺伝子多型に関する大規模研究である。

脂質代謝異常は、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、低HDLコレステロール血症、高LDLコレステロール血症の状態を含むが、いずれの症状もアテローム性動脈硬化の重要なリスク因子である。我々は、これらの各状態のそれぞれと遺伝的変異との関係を調査した。本研究の目的は、脂質代謝異常に関与する遺伝子多型を同定し、この知見に基づいて、ある者に対して脂質代謝異常を予防するための有用な情報を与えることである。

30

【0005】

上記課題を解決するための第1の発明に係る脂質代謝異常のリスク検出法は、ABCA1の1051G A、ABCB1のT G、ABCC6の3826G A、ABCC8の3857G A、ACAT2の41A G、ADIPOQの62G T、ADIPOR1のC G、AGTの-6G A、AGTR2の3123C A、AKAP10の2073A G、APOA5の-1131T C、-3A G、553G T、APOBのC T、T C、APOC3の1100C T、APOEの4070C T、-219G T、3932T C、CD14の-260C T、CETPの-629C A、C T、CPB2のT C、CYP3A5の6986A G、CYP7A1の-204A C、ENPP1の97A C、EPHX2のG A、FABP2の2445G A、GJA4の1019C T、ITGB2の1323C T、LIPCの-250G A、LPLの1595C G、LTAの804C A、MMP1の-519A G、MTPの-493G T、P2RY12の744T C、PCSK9のA G、PDE4DのTAAA -、C T、PSMA6の-8C G、SERPINE1の6684G 5G、THBDの2136C T、THBS2の3949T G、TNFの-238G A、-850C T、UTS2の347G A、VAMP8のA Gのうちの少なくとも1個または2個以上の遺伝子多型と、性別、BMIとを評価因子とし、各評価因子のオッズ比を乗じた発症リス

40

50

クを計算し、この発症リスクを平均と分散またはパーセント区分に応じて3つ以上の複数の群を作成し、各群に応じて発症のリスクを検出することを特徴とする。

このとき、群を形成するときに使用する分散については、統計上の分散値、或いは標準偏差値(SD)、パーセントによる区分などを用いることができる。なお、遺伝子多型については、必ずしも上記46個には限られず、これら46個の多型のうちの任意の1個 - 45個、或いは本明細書中で示される上記46個の他の多型を含む47個以上で実施することもできる。

【0006】

本明細書中において、多型の記載方法は、次の通りである。原則として、各遺伝子について、「多型が生じている位置、データベースに登録されている塩基(A:アデニン、G:グアニン、C:シトシン、T:チミン) 多型塩基」の順で記載する。例えば、「ABC A 1の1051G A」は、ABC A 1の遺伝子について、1051位のGがAとなっている多型を意味している。また、場所の指定がない多型(例えば、ADIPOR 1のCG)については、表1 - 表6に記載のdbSNPのアクセス番号から、その内容を容易に理解することができる。

なお、ABC A 1の1051G Aについては、dbSNPのrs番号(rs2230806)を見ると、順方向(forward strand)に読んでG/A多型として記録されているが、逆方向(reverse strand)で読むとC/T多型となる。多くの文献について、このSNPは「1051G/A」多型として記載されているので、本明細書においても上記の通りに記載する。

【0007】

一般に多型は、集団(例えば、日本人集団、西洋人集団など)が異なると、その種類・頻度が異なることが知られている。このため、日本人以外の集団において、脂質代謝異常との関係が指摘されている多型であっても、必ずしも日本人集団においてそのような関連が認められるわけではない。このため、従来報告については、国または疾患が異なる場合には、必ずしも日本人における多型および脂質代謝異常との関連が裏付けられるわけではない。

【0008】

また、上記発明において、脂質代謝異常が高コレステロール血症の場合には、ABC A 1の1051G A、ABCC 8の3857G A、AGTの-6G A、APOA 5の-1131T C、APOBのT C、APOEの4070C T、3932T C、CD 14の-260C T、CETPのC T、ENPP 1の97A C、EPHX 2のG A、GJA 4の1019C T、LIPCの-250G A、LTAの804C A、PDE 4DのTAAA -、SERPINE 1の6684G 5G、VAMP 8のA Gのうち少なくとも1個または2個以上の遺伝子多型を検出することが好ましい。

【0009】

また、脂質代謝異常が高トリグリセリド血症の場合には、ACAT 2の41A G、APOA 5の-1131T C、553G T、APOC 3の1100C T、APOEの3932T C、CYP 3A 5の6986A G、CYP 7A 1の-204A C、ITGB 2の1323C T、LPLの1595C G、MMP 1の-519A G、MTPの-493G T、PCSK 9のA G、PDE 4DのC T、SERPINE 1の6684G 5G、THBDの2136C Tのうち少なくとも1個または2個以上の遺伝子多型を検出することが好ましい。

【0010】

また、脂質代謝異常が低HDLコレステロール血症の場合には、ABC B 1のT G、ADIP OQの62G T、AGTの-6G A、AGTR 2の3123C A、APOA 5の-3A G、-1131T C、553G T、APOBのC T、APOEの-219G T、3932T C、CD 14の-260C T、CETPの-629C A、LIPCの-250G A、LPLの1595C G、PSMA 6の-8C G、SERPINE 1の6684G 5G、TNFの-850C T、UTS 2の347G A

10

20

30

40

50

のうちの少なくとも1個または2個以上の遺伝子多型を検出することが好ましい。

【0011】

また、脂質代謝異常が高LDLコレステロール血症の場合には、ABCC8の3857G A、ADIPO R1のC G、AGTの-6G A、AGTR2の3123C A、AKAP10の2073A G、APOBのT C、APOEの4070C T、3932T C、CPB2のT C、FABP2の2445G A、LPLの1595C G、P2RY12の744T C、THBS2の3949T G、TNFの-238G Aのうちの少なくとも1個または2個以上の遺伝子多型を検出することが好ましい。

【発明の効果】

【0012】

10

本発明によれば、脂質代謝異常について、遺伝的リスクおよび発症リスクを判断するための検出法等が提供される。この発明を用いることにより、脂質代謝異常に対する予防が可能となり、高齢者の健康寿命延長・QOL向上・寝たきり防止ならびに今後の医療費削減など、医学的・社会的に大きく貢献できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

次に、本発明の実施形態について、図表を参照しつつ説明するが、本発明の技術的範囲は、これらの実施形態によって限定されるものではなく、発明の要旨を変更することなく様々な形態で実施することができる。また、本発明の技術的範囲は、均等の範囲にまで及ぶものである。

20

【0014】

<試験方法>

研究対象

研究対象は、2つの独立な母集団からなる5,421名であった。集団Aは4,002名から構成され、研究参加施設（岐阜県立岐阜病院、岐阜県立多治見病院、岐阜県立下呂温泉病院、弘前大学病院、黎明郷リハビリテーション病院）に、2002年10月から2007年3月までに、様々な症状または毎年の健康診断のために来院した者であった。集団Bは1,419名から構成され、群馬県における人口に基づく将来の老化および加齢障害の研究のため地域社会に暮らす高齢者であった。

研究プロトコルはヘルシンキ宣言に従い、三重大学医学部、弘前大学医学部、岐阜県国際バイオ研究所、東京都老人総合研究、および参加病院の倫理委員会によって承認された。各参加者に対しては書面によるインフォームドコンセントを得た。

30

【0015】

血中脂質濃度の測定

静脈血の採取は、早朝において各患者が一晩に渡って絶食し、脂質濃度低下のための適当な治療を受ける前に行った。血液サンプルは、4にて、1600×g、5分間遠心し、血清を分離した。血清は、脂質濃度を測定するまで-30にて保存した。血清中の全コレステロール（非特許文献36）、トリグリセリド（非特許文献37）、HDLコレステロール（非特許文献38）の濃度を周知方法によって測定した。LDLコレステロール濃度についても周知の方法（非特許文献39）、すなわちフリーデルの公式（Friedewald formula）に基づき、「血中LDLコレステロール濃度 = 血中全コレステロール濃度 - 血中HDLコレステロール濃度 - (0.2 × 血中トリグリセリド濃度)」。但し、血中トリグリセリド濃度が4.4 mmol/L以下の場合」として求めた（非特許文献40、41）。

40

【0016】

多型の選択

公開データベースの使用、および本発明者の鋭意検討により、195個の候補遺伝子を選択した。本発明者は、従来知見およびデータベースに基づき、これら195個の遺伝子について、258個の多型を選択した。これらの多型の多くは、プロモーター領域、エクソン、イントロンのスプライシングの供与部位或いは受容部位に多く位置しており、多

50

型の結果として、コードされたタンパク質の機能または発現に変化を与える可能性があるものであった。これら 258 個の多型は、下記表 1 - 表 6 に示した。なお、表中においては、左欄から順に、座位 (Locus)、遺伝子名 (Gene)、簡易記載 (Symbol)、多型 (Polymorphism)、多型データベース登録番号 (dbSNP) を示している。なお、多型データベース登録番号が無い場合には、NCBI 遺伝子バンクに登録されている番号を示した。各多型の野生型および変異型対立遺伝子は、情報源のものを用いた。

【 0 0 1 7 】

【表 1】

locus	Gene	Symbol	Polymorphism	dbSNP
14q32.1	Alpha-1-antichymotrypsin	AAC1	G/A (Ala-15Thr)	rs4934
16p13.11	Acyl-CoA synthase/Hypertension-associated SA, rat, homolog of	ACSM3	A-7G (exon 13)	rs13306607
3q28	Adiponectin locus/Adaptor-related protein complex 2, MU-1 subunit	ADIPOQ	G62T in intron 2 (SNP-276)	rs1501299
17q23	Angiotensin I- converting enzyme	ACE	A -240 T	rs4291
1q42-q43	Angiotensinogen	AGT	G-6A	rs5051
4q26-q28	Annexin V/Annexin A5	ANXA5	C-1T	rs11575945
11q23	Apolipoprotein A-I	APOA1	G-75A	rs670
11q23	Apolipoprotein C-III	APOC3	C1100T	rs4520
11q23	Apolipoprotein C-III	APOC3	C-482T	rs2854117
19q13.2	Apolipoprotein E	APOE	C4070T (Arg158Cys)	rs7412
19q13.2	Apolipoprotein E	APOE	G-219T	rs405509
19q13.2	Apolipoprotein E	APOE	T3932C (Cys112Arg)	rs429358
9q22-q31	ATP-binding cassette transporter 1/ATP-binding cassette, subfamily A, member 1	ABCA1	G1051A (Arg219Lys)	rs2230806
1p36.2	Atrial natriuretic peptide/Natriuretic peptide precursor A	NPPA	G664A (Val7Met)	rs5063
10q24-q26	Beta-1-adrenergic receptor	ADRB1	G1165C (Gly389Arg)	rs1801253
5q32-q34	Beta-2-adrenergic receptor	ADRB2	C/G (Gln27Glu)	rs1042714
5q32-q34	Beta-2-adrenergic receptor	ADRB2	A46G (Arg16Gly)	rs1042713
8p12-p11.2	Beta-3-adrenergic receptor	ADRB3	T190C (Trp64Arg)	rs4994
4q28	b-Fibrinogen/Fibrinogen, B beta polypeptide	FBG	G8059A (Arg448Lys)	rs4220
4q28	b-Fibrinogen/Fibrinogen, B beta polypeptide	FBG	G-455A	rs1800790
2q37.3	Calpain 10	CAPN10	G4852A (SNP-43)	rs3792267
14q11.2	Cathepsin G	CTSG	A/G (Asn125Ser)	rs45567233
3p21	CC chemokine receptor 2/Chemokine, CC motif, receptor 2	CCR2	G190A (Val64Ile)	rs1799864
21q22.3	CD18/Integrin, beta-2	ITGB2	C1323T	rs235326
16q21	Cholesteryl ester transfer protein, plasma	CETP	A1061G (Ile405Val)	rs5882
13q34	Coagulation factor VII	F7	G11496A (Arg553Gln)	rs6046
5q33-qter	Coagulation factor XII	GJA4	C46T	rs1801020
1p35.1	Connexin 37/Gap junction protein, alpha-4	ENG	C1019T (Pro319Ser)	rs1764391
9q34.1	Endoglin	NOS3	C1691G (Asp366His)	rs1800956
7q36	Endothelial Nitric oxide synthase/Nitric oxide synthase 3	EDN1	T-786C	rs2070744
6p24-p23	Endothelin 1	SELE	G5665T (Lys198Asn)	rs5370
1q23-q25	E-selectin/Selectin E	ESR1	A561C (Ser128Arg)	rs5361
6q25.1	Estrogen receptor 1	FABP2	T-1989G	rs2071454
4q28-q31	Fatty acid-binding protein 2	FBN1	G2445A (Ala54Thr)	rs1799883
15q21.1	Fibrillin 1	GCLM	T1875C in exon 15	rs8033037
1p22.1	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	GYS1	C-588T	rs41303970
19q13.3	Glycogen synthase 1	PPP1R3A	A260G (Met416Val)	rs5447
7q11.23-q21.11	glycogen-associated regulatory subunit of type 1 protein phosphatase/Protein phosphatase 1, regulatory subunit 3A	PPP1R3A	G/T (Ser883Arg)	rs1800000
7q11.23-q21.11	glycogen-associated regulatory subunit of type 1 protein phosphatase/Protein phosphatase 1, regulatory subunit 3A	PPP1R3A	G2711T (Tyr905Asp)	rs1799999
5q23-q31	Glycoprotein Ia/Integrin, alpha-2	ITGA2	A1648G (Lys505Glu)	rs10471371
17pter-p12	Glycoprotein Iba/Glycoprotein Ib, platelet, alpha polypeptide	GP1BA	T-5C	rs2243093
17pter-p12	Glycoprotein Iba/Glycoprotein Ib, platelet, alpha polypeptide	GP1BA	C1018T (Thr145Met)	rs6065

【 0 0 1 8 】

10

20

30

40

【 表 2 】

6q22-q23	Glycoprotein PC-1/Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	ENPP1	A97C (Lys121Gln)	rs1044498
19q13.4	Glycoprotein VI, platelet	GP6	T13254C (Ser219Pro)	rs1613662
12p13	G-protein b3 subunit/Guanine nucleotide-binding protein, beta-3	GNB3	C825T (splice variant)	rs5443
15q21-q23	Hepatic lipase/Lipase, hepatic	LIPC	G-250A	rs2070895
11p15.5	Insulin	INS	T-23A	rs689
13q12.1	Insulin promoter factor 1	PDX1	3G-108/4G	SNP登録なし
2q36	Insulin receptor substrate 1	IRS1	G3931A (Gly972Arg)	rs1801278
1q31-q32	Interleukin 10	IL10	A-592C	rs1800872
1q31-q32	Interleukin 10	IL10	T-819C	rs1800871
7p21	Interleukin 6	IL6	G-572C	rs1800796
8p22	Lipoprotein lipase	LPL	C1595G (Ser447Stop)	rs328
6p21.3	Lymphotoxin-alpha	LTA	C804A (Thr26Asn)	rs1041981
11q22-q23	Matrix metalloproteinase1	MMP1	IG/2G at _1607	rs1799750
11q22.2-q22.3	Matrix metalloproteinase12	MMP12	A-82G	rs2276109
1p36.3	5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase	MTHFR	C677T (Ala222Val)	rs1801133
16q13	Matrix metalloproteinase2	MMP2	C-1306T	rs243865
16q24	NADH/NADPH oxidase p22 phox/Cytochrome b(-245), alpha subunit	CYBA	C242T (His72Tyr)	rs4673
7q21.3	Paraoxonase 1	PON1	G584A (Gln192Arg)	rs662
7q21.3	Paraoxonase 2	PON2	C/G (Ala148Gly)	rs12026
7q32	Paired box gene 4	PAX4	C567T (Arg121Trp)	SNP登録なし
17q23	Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1	PECAM1	C1454G (Leu125Val)	rs668
3p25	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma	PPARG	C34G (Pro12Ala)	rs1801282
5q13	Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory, 1	PIK3R1	G/A (Met326Ile)	rs3730089
3p22-p21.3	Phospholipase C, delta-1	PLCD1	G864A (Arg257His)	rs933135
7q21.3-q22	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	SERPINE1	4G/5G at _668	rs1799768
6p21.2-p12	Platelet-activating factor acetylhydrolase/Phospholipase A2, group VII	PLA2G7	G994T (Val279Phe)	rs16874954
11p15.1	Potassium channel,	KCNJ11	A/G (Glu23Lys)	rs5219
20q13.11-q13.13	Prostaglandin I2 synthase	PTGIS	C1117A (codon 373)	rs5629
11q23	Stromelysin-1/Matrix metalloproteinase 3	MMP3	5A/6A at _1171	rs3025058
11p15.1	Sulfonylurea receptor 1 gene/ATP-binding cassette, subfamily C, member 8	ABCC8	G3857A (Arg1273Arg)	rs1799859
13q14.11	Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor/Carboxypeptidase B2, plasma	CPB2	G/A (Ala147Thr)	rs3742264
20p11.2	Thrombomodulin	THBD	C2136T (Ala455Val)	rs1042579
3q26.3-q27	Thrombopoietin	THPO	A5713G	rs6141
5q13	Thrombospondin IV	THBS4	G1186C (Ala387Pro)	rs1866389
8p12	Tissue-type plasminogen activator/Plasminogen activator, tissue	PLAT	C-7351T	rs2020918
6p21.3	Tumor necrosis factor	TNF	C-863A	rs1800630
6p21.3	Tumor necrosis factor	TNF	G-238A	rs361525
6p21.3	Tumor necrosis factor	TNF	C-850T	rs1799724
4q31	Uncoupling protein 1	UCP1	A-112C	rs10011540
11q13	Uncoupling protein 2	UCP2	G-866A	rs659366
11q13	Uncoupling protein 3	UCP3	C-55T	rs1800849
8p12-p11.2	Werner helicase/RecQ protein-like 2	RECQL2	T/C (Cys1367Arg)	rs1346044
17q23	Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1	PECAM1	G2201A (Gly670Arg)	rs1131012
3q21-q25	Angiotensin receptor 1	AGTR1	A1166C	rs5186

【 0 0 1 9 】

10

20

30

40

【表 3】

【 0 0 2 0 0 1】	Xq22-q23	Angiotensin II receptor, type 2	AGTR2	G1675A	rs1403543
	19q13.1	Transforming growth factor, beta-1	TGFB1	C-509T	rs1800469
	19p13.3-p13.2	Intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	G/A (Glu469Lys)	rs5498
	4q22-q24	Microsomal triglyceride transfer protein, 88-kD	MTP	G-493T	rs1800591
	3p25	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma	PPARG	C-681G	rs10865710
	4p15.1	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, coactivator 1	PPARGC1	G/A (Gly482Ser)	rs8192678
	6p12	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	GCLC	C-129T	rs17883901
	7q21.3	Paraoxonase 1	PON1	G-162A	rs705381
	7q21.3	Paraoxonase 1	PON1	A532G (Arg160Gly)	rs13306698
	7q11.2	Syntaxin 1A	STX1A	T205C (Asp68Asp)	rs2293485
	3q27	Adiponectin/Adipocyte, C1Q, and collagen domain containing	ADIPOQ	C-11377G	rs266729
	3p22	Transforming growth factor-beta receptor, type II	TGFB2	C1167T (Asn389Asn)	rs2228048
	19p13.2	Insulin receptor	INSR	C/A (SNP84)	rs2860172
	16q21	Cholesteryl ester transfer protein, plasma	CETP	C-629A	rs1800775
	6q27	Thrombospondin II	THBS2	T3949G (3' UTR)	rs8089
	6p21.3	Advanced glycosylation end product-specific receptor	AGER	G268A (Gly82Ser)	rs2070600
	19p13.3	Resistin	RETN	G+62A	rs3745368
	17q11.2-q12	RANTES/Chemokine, CC motif, ligand 5	CCL5	C-28G	rs2280788
	3p21	Chemokine, CC motif, receptor 5	CCR5	G59029A	rs1799987
	18q21.1	Lipase, endothelial	LIPG	C584T (Thr111Ile)	rs2000813
	12p13-p12	Low density lipoprotein, oxidized, receptor 1	OLR1	G501C (Lys167Asn)	rs11053646
	20q11.2-q13.1	Matrix metalloproteinase 9	MMP9	G/A (Arg279Gln)	rs17576
	5q31.1	Monocyte differentiation antigen CD14	CD14	C-260T	rs2569190
	6p12	Vascular endothelial growth factor	VEGF	C936T	登録なし
	22q12	Heme oxygenase 1	HMOX1	G/C (Asp7His)	rs2071747
	4q31.22	Endothelin receptor, type A	EDNRA	A-231G	rs1801708
	17p11.1	A-kinase anchoring protein 10	AKAP10	A2073G (Ile646Val)	rs203462
	3pter-p21	Fractalkine receptor/Chemokine, CX3C motif, receptor 1	CX3CR1	C926T (Thr280Met)	rs3732378
	7q11.2	Elastin	ELN	G/A (Gly422Ser in exon 20)	rs2071307
	2q31	Collagen, type III, alpha-1	COL3A1	G/A (Ala698Thr in exon 30)	rs1800255
	2q31	Collagen, type III, alpha-1	COL3A1	A/G (Ile1205Val in exon 48)	rs2271683
	22q12	Heme oxygenase 1	HMOX1	T-413A	rs2071746
	19p13.3	Resistin	RETN	C-180G	rs1862513
	1p36	Urotensin II	UTS2	G347A (Ser89Asn)	rs2890565
	3q24-q25	Purinergic receptor P2Y, G protein-coupled, 12	P2RY12	T744C	rs2046934
	3q21-q25	Angiotensin receptor 1	AGTR1	G/A (Ala163Thr)	rs12721226
	Xq22-q23	Angiotensin II receptor, type 2	AGTR2	C3123A	rs11091046
	11q23	Apolipoprotein A-I	APOA1	T84C	rs5070
	11q23	Apolipoprotein A-V	APOA5	T-1131C	rs662799
	17q23-qter	Apolipoprotein H	APOH	G341A (Ser88Asn)	rs1801692
	10q11.2	Arachidonate 5-lipoxygenase	ALOX5	G/A (Glu254Lys)	rs2228065
	9q22-q31	ATP-binding cassette, subfamily A, member 1	ABCA1	A2583G (Ile823Met)	rs4149313
	3q26.1-q26.2	Butyrylcholinesterase	BCHE	G1615A (Ala539Thr)	rs1803274
	22q11.2	Catechol-O-methyltransferase	COMT	G/A (Val158Met)	rs4680
	7q11.2	CD36 antigen	CD36	G30294C	rs1049673

10

20

30

40

【表 4】

7q22.1	Collagen, type I, alpha-2	COL1A2	G/C (Ala459Pro)	rs42524
1p35.1	Gap junction protein, beta-4	GJB4	C/T (Arg103Cys)	rs9426009
1q21-q23	C-reactive protein, pentraxin-related	CRP	C1444T	rs1130864
1q25.2-q25.3	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	PTGS2	G/C	rs20417
17q21.1-q21.2	Chemokine, CC motif, ligand 11	CCL11	G/A (Ala23Thr)	rs3744508
22q12-q13	Lectin, galactoside-binding, soluble, 2	LGALS2	C3279T (intron 1)	rs7291467
7p15-p13	Glucokinase	GK1	G-30A	rs1799884
3p21.3	Glutathione peroxidase	GPX1	C/T (Pro198Leu)	rs1050450
11q23.3-q25	Heat-shock 70-kD protein 8	HSPA8	A-110C	rs1008438
20q12-q13.1	Hepatocyte nuclear factor 4-alpha	HNF4A	A/G	rs2425640
2q14	Interleukin 1-beta	IL1B	C-511T	rs16944
1p34.3	Ischemia/reperfusion inducible protein	FLJ23476	C/A (Pro55Gln)	rs16824518
1p34.3	Ischemia/reperfusion inducible protein	FLJ23476	T/C (Met769Thr)	rs11488569
9q34.2-q34.3	Prostaglandin D2 synthase, brain	PTGDS	A4111C	rs6926
6p21.2-p21.1	Peroxisome proliferator-activated receptor-delta	PPARD	T294C	rs2016520
5q12	Phosphodiesterase 4D, cAMP-specific	PDE4D	TAAA/- (3'-UTR)	rs3839219
20q13.31	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, soluble	PCK1	C-232G	rs2071023
7q21.3-q22	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	SERPINE1	A/G (Tyr243Cys)	rs13306846
1p34.2	Polycystic kidney disease 1-like	KIAA0319L	G/A (Gly243Asp)	rs1635712
13q34	Protein Z	PROZ	G79A	rs3024735
17q11.2-q12	Chemokine, CC motif, ligand 5	CCL5	G-403A	rs2107538
19p13.2	Resistin	RETN	C-420G (C-180G)	rs1862513
8p21-p12	Epoxide hydrolase 2, cytosolic	EPHX2	G/A (Arg287Gln)	rs751141
6p21	Solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 8	SLC26A8	A/G (Ile639Val)	rs2295852
17p11.2	Sterol regulatory element-binding transcription factor 1	SREBF1	G-36/-	登録なし
11q23	Matrix metalloproteinase 3	MMP3	A/G (Lys45Glu)	rs679620
13q14.11	Carboxypeptidase B2, plasma	CPB2	T/C (Ile347Thr)	rs1926447
1p22-p21	Coagulation factor III	F3	A-603G	rs1361600
6q22	v-Ros avian UR2 sarcoma virus oncogene homolog 1	ROS1	G/A (Asp2213Asn)	rs529038
17p13	Chemokine, CXC motif, ligand 16	CXCL16	C/T (Ala181Val)	rs2277680
16p13	Major histocompatibility complex, class II, transactivator	MHC2TA	A-168G	rs3087456
1q25	Tumor necrosis factor ligand superfamily, member 4	TNFSF4	A/G	rs3850641
1p34.1-p32	Protein convertase, subtilisin/kexin-type, 9	PCSK9	A23968G (Glu670Gly)	rs505151
1p36.13-q41	Adiponectin receptor 1	ADIPOR1	C/G	rs1139646
1p36.13-q41	Adiponectin receptor 1	ADIPOR1	A/C	rs10920531
13q12	Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	ALOX5AP	A162C	rs4769055
13q12	Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	ALOX5AP	T8733C	rs3803278
Xq26	CD40 ligand	CD40LG	A-3459G	rs3092952
1q32	Complement factor H	CFH	T/C (Tyr402His)	rs1061170
13q34	Collagen, type IV, alpha-1	COL4A1	A/C (Gln1334His)	rs3742207
1q21-q23	C-reactive protein, pentraxin-related	CRP	G1846A	rs1205
8p21-p12	Epoxide hydrolase 2, cytosolic	EPHX2	A9846G (Lys55Arg)	rs41507953
16q24.3	Forkhead box C2	FOXC2	C-512T	rs34221221
3q26.31	Ghrelin receptor	GHSR	A/G	rs509035

【 0 0 2 1 】

10

20

30

40

【 表 5 】

Xq28	Interleukin 1 receptor-associated kinase 1	IRAK1	C/T	rs7061789
Xq28	Interleukin 1 receptor-associated kinase 1	IRAK1	C/T	rs1059703
Xq28	Interleukin 1 receptor-associated kinase 1	IRAK1	A/C	rs3027898
5q34	Potassium channel, calcium-activated, large conductance, subfamily M, beta member 1	KCNMB1	G/A (Glu65Lys)	rs11739136
4q32.3	Palladin, mouse, homolog of	KIAA0992	G/A	rs12510359
1p34	Low density lipoprotein receptor-related protein 8	LRP8	T/G (Asp46Glu)	rs3820198
1p34	Low density lipoprotein receptor-related protein 8	LRP8	G/A (Arg736Gln)	rs5172
3q13.2-q21	Limbic system-associated membrane protein	LSAMP	A/G	rs1676232
12q22	Leukotriene A4 hydrolase	LTA4H	C/T	rs1978331
12q22	Leukotriene A4 hydrolase	LTA4H	C/T	rs1767715
12q22	Leukotriene A4 hydrolase	LTA4H	A/G	rs2540482
12q22	Leukotriene A4 hydrolase	LTA4H	A/G	rs2660845
12q22	Leukotriene A4 hydrolase	LTA4H	C/T	rs2540475
11q22-q23	Matrix metalloproteinase 1	MMP1	A-519G	(AY769434)
11q22-q23	Matrix metalloproteinase 1	MMP1	T-340C	(AY769434)
7p15.1	Neuropeptide Y	NPY	C/T	rs5574
7p15.1	Neuropeptide Y	NPY	A/G	rs9785023
7p15.1	Neuropeptide Y	NPY	A/G	rs16147
1q44	Olfactory receptor, family 13, subfamily G, member 1	OR13G1	A/G (Ile132Val)	rs1151640
5q12	Phosphodiesterase 4D, cAMP-specific	PDE4D	C/T	rs966221
9q32-q33.3	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1	PTGS1	A/T	rs10306135
9q32-q33.3	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1	PTGS1	C/T	rs883484
6q22	v-Ros avian UR2 sarcoma virus oncogene homolog 1	ROSI	G/C (Cys2229Ser)	rs619203
1p36	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4	TNFRSF4	A/G	rs2298212
16p11.2	Vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1	VKORC1	T2255C	rs2359612
19p13.2	Zink finger protein 627	ZNF627	A/G	rs4804611
7q11.2	Elastin	ELN	G659C	rs8326
7q11.23	Lim domain kinase 1	LJMK1	G-916A	rs6460071
7q11.23	Lim domain kinase 1	LJMK1	G-428A	rs710968
17p11.2	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B	TNFRSF13B	IVS3, C25A	rs2274892
17p11.2	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B	TNFRSF13B	C/T (Pro251Leu)	rs34562254
19q13.2	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein U-like 1	HNRPUL1	A/T	rs11881940
2p12-11.2	Vesicle-associated membrane protein 8	VAMP8	A/G	rs1010
20q11.2-13.1	Matrix metalloproteinase 9	MMP9	A-820G	rs11697325
1q21.1	Gap junction protein, alpha-5	GJA5	G-44A	rs35594137
2p24	Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase 2	ROCK2	C125592A (Thr431Asn)	rs9808232
14q13	Proteasome subunit, alpha-type, 6	PSMA6	C-8G	rs1048990
16p13.3	Deoxyribonuclease I	DNASE1	A2317G (Gln222Arg)	rs1053874
13q12	Klotho	KL	T/G (Phe352Val)	rs9536314
15q21-23	Lipase, hepatic	LIPC	C-514T	rs1800588
1p34.1-32	Proteinase convertase, subtilisin/kexin-type, 9	PCSK9	G1327A (Ala443Thr)	rs28362263
8p22	Lipoprotein lipase	LPL	G/A (Asp9Asn)	rs1801177
8p22	Lipoprotein lipase	LPL	A/G (Asn291Ser)	rs268
11q23	Apolipoprotein A-V	APOA5	A-3G	rs651821

【 0 0 2 2 】

10

20

30

40

【 表 6 】

11q23	Apolipoprotein A-V	APOA5	C56G (Ser19Trp)	rs3135506
9q22-31	ATP-binding cassette, subfamily A, member 1	ABCA1	C-14T	rs1800977
9q22-31	ATP-binding cassette, subfamily A, member 1	ABCA1	G102555A (Val771Met)	rs2066718
16q21	Cholesteryl ester transfer protein, plasma	CETP	G21903C (3'-UTR)	rs289742
15q21-23	Lipase, hepatic	LIPC	A1075C	rs3829462
2p24	Apolipoprotein B	APOB	C/T (Thr111Ile)	rs1367117
2p24	Apolipoprotein B	APOB	T/C (Val591Ala)	rs679899
11q22.3-23.1	Acetyl-CoA acetyltransferase 1	ACAT1	G-77A	rs11545566
1p31	Leptin receptor	LEPR	G/A (Arg223Gln)	rs1137101
11q23	Apolipoprotein A-V	APOA5	G553T (Gly185Cys)	rs2075291
16p11.2	Apolipoprotein B48 receptor	APOB48R	G1255C (Ala419Pro)	rs180743
22q12-13.1	Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha	PPARA	C484G (Leu162Val)	rs1800206
1p34.1-32	Protein convertase, subtilisin/kexin-type, 9	PCSK9	C-161T	rs2495480
1p34.1-32	Protein convertase, subtilisin/kexin-type, 9	PCSK9	A/G (Ile474Val)	rs562556
3p21.2-14.1	Inter-alpha-trypsin inhibitor, heavy chain 4	ITIH4	IVS17+8C/T	rs3821831
7p15	G-substrate	GSBS	T-1323C	rs2284226
8q11-13	Retinitis pigmentosa 1 gene	RPI1	A/T (Asn985Tyr)	rs2293869
16p13.1	ATP-binding cassette, subfamily C, member 6	ABCC6	G3826A (Arg1268Gln)	rs2238472
22q13	Sterol regulatory element-binding transcription factor 2	SREBF2	G1784C (Gly595Ala)	rs4822063
2p21	ATP-binding cassette, subfamily G, member 8	ABCG8	G/C (Asp19His)	rs11887534
11q13.4	Low density lipoprotein receptor-related protein 5	LRP5	T4037C (Val1330Ala)	rs3736228
12p13	Guanine nucleotide-binding protein, beta-3	GNB3	C1429T	rs5446
12p13	Adiponectin receptor 2	ADIPOR2	G795A	rs16928751
6q25.3-26	Acetyl-CoA acetyltransferase 2	ACAT2	A41G (Glu/Gly)	rs9658625
6q25.3-26	Acetyl-CoA acetyltransferase 2	ACAT2	C734T (Thr/Ile)	rs2272296
4q31	Uncoupling protein 1	UCP1	A-3826G	rs1800592
2p11	Fatty acid-binding protein 1	FABP1	A/G (Thr94Ala)	rs2241883
3p21.31	SREBF cleavage-activating protein	SCAP	A2386G (Ile796Val)	rs12487736
7q21.1	ATP-binding cassette, subfamily B, member 1	ABCB1	T/G (Ser893Ala)	rs2032582
16q21	Cholesteryl ester transfer protein, plasma	CETP	C/T in intron 1	rs708272
8q11-12	Cytochrome P450, subfamily VIIA, polypeptide 1	CYP7A1	A-204C	rs3808607
7q22.1	Cytochrome P450, subfamily IIIA, polypeptide 4	CYP3A4	A13989G (Ile118Val)	(NC_000007.12)
7q22.1	Cytochrome P450, subfamily IIIA, polypeptide 5	CYP3A5	A6986G in intron 3	rs776746
9q22-31	ATP-binding cassette, subfamily A, member 1	ABCA1	C-477T	rs2422493
19p13.2	Low density lipoprotein receptor	LDLR	C/T (Val653Val)	rs5925
19p13.2	Low density lipoprotein receptor	LDLR	C/T (Asn591Asn)	rs688
12q24.31	Scavenger receptor class B, member 1	SCARB1	G403A (Val135Ile)	rs5891
11q23.3	C1q and tumor necrosis factor related protein 5	C1QTNF5	A/T	rs9640
11q23.3	C1q and tumor necrosis factor related protein 5	C1QTNF5	C/T	rs11217241

【 0 0 2 3 】

遺伝子型の検出方法

7 mL の静脈血を 50 mmol/L EDTA (ジナトリウム塩) を含むチューブに採取 50

し、ゲノムDNAをキット(ゲノミックス社製)によって分離した。258個の多型の遺伝子型は、PCRと配列特異的オリゴヌクレオチドプローブをサスペンション・アレイ・テクノロジー(SAT:Luminex 100)と組み合わせて使用する方法によって決定した(G&Gサイエンス株式会社)。プライマー、プローブ、その他の条件は、下表7に示した。表7は左から順に、遺伝子記(Gene Symbol)、多型(Polymorphism)、センスプライマー(Sense primer)、アンチセンスプライマー(Antisense primer)、プローブ1(Probe 1)、プローブ2(Probe 2)、アニーリング温度(Annealing)、およびサイクル数(Cycles)を示した。また、詳細な方法については、既報のもの(非特許文献42)を基本として、適宜に増幅条件を変えて行った。なお、脂質代謝異常との関連が認められなかった多型を検出するための条件については記載を省略した。

【0024】

PCR - SSOP - Lumine x 法

方法の詳細については、非特許文献 4 2 に記載の通りである。以下には、この方法の概要について説明する。

図 1 には、Lumine x 100 フローサイトメトリーで検出するマイクロビーズの微細構造と特徴を示した。マイクロビーズ (図中の符号 (A)) は、直径が約 $5.5 \mu\text{m}$ 程度であり、ポリスチレン製である。ビーズ表面には、特異的な塩基配列を認識するプローブが結合されている。各ビーズには、一種類のプローブが結合されている。このマイクロビーズには、赤色素と赤外色素との割合を変化させることにより、図中の符号 (B) に示すように、最大で 100 種類のを混合した状態で、各ビーズの同定が行えるようになっている。複数種類のプローブを備えたマイクロビーズ (但し、各マイクロビーズには一種類のプローブのみ) を適当な割合で混合し、100 ビーズ / μL となるようにしたビーズミックスを調製した (図中の符号 (C)) 。

10

【 0 0 2 6 】

図 2 には、PCR - SSOP - Lumine x 法の手順の概要を示した。

< 増幅反応 (Amplification) >

目的とする DNA を増幅する PCR 反応には、5' 末端をビオチンでラベルしたプライマーを用いた。1.5 mM 塩化マグネシウムを含む 1 x PCR 溶液 (50 mM KCl、10 mM Tris - HCl、pH 8.3)、2 % DMSO、0.2 mM dNTPs、及び $0.1 \mu\text{M} - 10 \mu\text{M}$ プライマーセットを混合し、Taq DNA ポリメラーゼ (50 U / mL) と 50 ng - 100 ng のゲノム DNA を加えて 25 μL とした。PCR 反応は、95 ° で 10 分間処理の後、94 ° で 20 秒間の変性、60 ° で 30 秒間のアニーリング、及び 72 ° で 30 秒間の伸長を 1 サイクルとし、これを 50 サイクル繰り返した。機器として Gene Amp 9700 サーマルサイクラー (アプライドバイオシステムズ社製) を用いた。

20

【 0 0 2 7 】

< ハイブリダイゼーション (Hybridization) >

増幅した DNA を変性した後、ビーズミックスとハイブリダイズさせた。96 ウエルプレートの各ウエルに、5 μL の増幅反応後の PCR 増幅液、5 μL のビーズミックス、及び 40 μL のハイブリダイズ用緩衝液 (3.75 M TMAC、62.5 mM TB (pH 8.0)、0.5 mM EDTA、0.125 % N - ラウロイルザルコシン) を添加し、全量 50 μL とした。この混合液を添加した 96 ウエルプレートについて、95 ° で 2 分間の変性、及び 52 ° で 30 分間のハイブリダイゼーションを行った (Gene Amp 9700 サーマルサイクラーを用いた。) 。

30

図 2 中には、増幅した DNA を認識するプローブを有するビーズ (1) のみが、DNA と結合する様子が示されている。

【 0 0 2 8 】

< ストレプトアビジン - フィコエリスリン反応 (SA - PE Reaction) >

次に、上記ビーズミックス - DNA を SA - PE と反応させた。ハイブリダイゼーション反応の後、各ウエルに 100 μL の PBS - Tween (1 x PBS (pH 7.5)、0.01 % Tween - 20) を添加し、1000 x g で 5 分間の遠心を行い、上清を取り去ることで、マイクロビーズを洗浄した。各ウエルに残ったマイクロビーズに、それぞれ 70 μL の SA - PE 溶液 (PBS - Tween により、市販品 (G & G サイエンス株式会社製) を 100 倍希釈したもの) を添加し混合した後、52 ° で 15 分間の反応を行った (Gene Amp 9700 サーマルサイクラーを用いた。) 。

40

図 2 中には、ビーズ (1) のプローブにのみビオチン化 DNA が結合しているので、そのビオチンに SA - PE が結合する様子が示されている。

【 0 0 2 9 】

< 測定 (Measurement) >

次に、反応後のサンプルは Lumine x 100 を用いて、ビーズ種類の同定と、そのビーズに PE が結合しているか否かを判定した。測定は 2 種類のレーザを使用して行い、

50

ビーズの種類は635nmレーザーにより同定し、PE蛍光は532nmレーザーを用いて定量した。オリゴビーズに結合したDNAは1測定あたり各々のビーズを最低50個ずつ測定し、定量されたPEの蛍光強度の中央値(MFI)を使用した。

図2中には、各ビーズ(1)-(3)が同定され、かつビーズ(1)にのみPEが測定されたことから、ビーズ(1)に結合させたプローブが認識するDNAが増幅された様子が示されている。

【0030】

統計解析

臨床データは、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、低HDLコレステロール血症、高LDLコレステロール血症の患者群とコントロール群との間で、対応のないスチューデントt検定により比較した。質的データは、カイ二乗検定によって比較した。対立遺伝子頻度は遺伝子カウント法によって概算し、ハーディ・ワインベルク平衡にあてはまるかどうかを判断するためにカイ二乗検定を使った。遺伝子型分布は、2つの群から構成される遺伝モデルと高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、低HDLコレステロール血症、高LDLコレステロール血症の患者群とコントロール群との間でカイ二乗検定(2x2)によって比較した。遺伝モデルは、優性モデルは「変異型のホモ接合体とヘテロ接合体の結合群」対「野生型のホモ接合体」(BB+AB対AA)、劣性モデルは「変異型のホモ接合体」対「野生型のホモ接合体とヘテロ接合体の結合群」(BB対AA+AB)である。

10

【0031】

危険率(p値)が5%未満($p < 0.05$)で脂質代謝異常の各疾患と関連した多型の遺伝モデルは、疾患の発症に関係があると思われる要因(交絡因子)として、他の背景因子(年齢(age:連続値)、性別(sex:女性=0、男性=1))とともに、強制投入法による多項ロジスティック回帰分析により解析した。このとき、背景因子および各遺伝子型を独立変数とし、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、低HDLコレステロール血症、高LDLコレステロール血症を従属変数とした。各遺伝子型は、優性、劣性遺伝モデルに従って評価し、p値、オッズ比、および95%信頼区間を計算した。

20

【0032】

上記多項ロジスティック回帰分析により、危険率(p値)が5%未満($p < 0.05$)で脂質代謝異常の各疾患と関連した多型の遺伝モデルまたは他の背景因子の効果を確認するために、ステップワイズ変数増加法により解析を行った。このとき、背景因子に関しては、さらに肥満指数(body mass index: BMI:連続値)、喫煙状態(smoking:非喫煙者=0、喫煙者=1)を独立変数として追加し、解析を行った。対象の選択基準は組み入れ規準(inclusion criteria)を0.25とし、除外規準(external validity)を0.1とした。

30

【0033】

上記解析の結果、危険率(p値)が3%未満($p < 0.03$)であった背景因子および多型の遺伝モデルを脂質代謝異常の各疾患と有意に関連する因子として選択した。同じ多型で優性モデル(BB+AB対AA)と劣性モデル(BB対AA+AB)の両者のp値が3%未満であった場合は、優性モデルを採用した。

40

【0034】

脂質代謝異常と遺伝モデルまたは他の背景因子の多重比較の結果を得る際は、危険率5%未満($p < 0.05$)は統計的に有意であると見なし、ステップワイズ変数増加法による解析では危険率3%未満($p < 0.03$)を統計的に有意であると見なした。統計的有意性は、両側検定によって試験した。統計解析は、SPSS 13.0(エス・ピー・エス・エス株式会社製)によって実行した。

【0035】

<試験結果>

5,421名の研究対象、集団Aおよび集団Bに関する背景データを表8に示した。表には、左欄より順に、特徴(Characteristic)、被験者集団A(Subject panel A)、お

50

よび被験者集団 B (Subject panel B) を示している。また、特徴欄は、上より順に、者数 (No. of subjects)、年齢 (Age)、性別 (男性 / 女性) (Sex(male/female))、肥満指数 (Body mass index)、血中総コレステロール (Serum total cholesterol)、高コレステロール者率 (Hypercholesterolemia) 血中トリグリセリド (Serum triglycerides)、高トリグリセリド者率 (Hypertriglyceridemia)、血中 HDL - コレステロール (Serum HDL-cholesterol)、低 HDL コレステロール者率 (Low HDL-cholesterol)、血中 LDL - コレステロール (Serum LDL-cholesterol)、及び高 LDL コレステロール者率 (High LDL-cholesterol) を示している。

【 0 0 3 6 】

【 表 8 】

10

Characteristics of the 5,421 study subjects

Characteristic	Subjecte panel A	Subjecte panel B	
Hypercholesterolemia			
No. of subjects	3,819	1,419	
Age (years)	64.9±10.9	72.3±5.6	
Sex (male/female,%)	58.4/41.6	47.8/52.2	
Body mass index (kg/m ²)	23.5±3.3	23.1±3.1	
Serum total cholesterol (mmol/l)	5.21±1.01	5.09±0.85	20
Hypercholesterolemia (%)	29.2	24.9	
Hypertriglyceridemia			
No. of subjects	3,782	1,419	
Age (years)	64.9±10.9	72.3±5.6	
Sex (male/female,%)	58.5/41.5	47.8/52.2	
Body mass index (kg/m ²)	23.6±3.3	23.1±3.1	
Serum triglycerides (mmol/l)	1.65±1.41	1.62±0.96	30
Hypertriglyceridemia (%)	35.0	35.9	
Low HDL-cholesterol			
No. of subjects	3,763	1,419	
Age (years)	64.8±10.9	72.3±5.6	
Sex (male/female,%)	58.2/41.8	47.8/52.2	
Body mass index (kg/m ²)	23.6±3.3	23.1±3.1	
Serum HDL-cholesterol (mmol/l)	1.36±0.45	1.50±0.38	
Low HDL-cholesterol (%)	19.8	8.17	40
High LDL-cholesterol			
No. of subjects	3,684	1,419	
Age (years)	64.9±10.9	72.3±5.6	
Sex (male/female,%)	58.3/41.7	47.8/52.2	
Body mass index (kg/m ²)	23.6±3.3	23.1±3.1	
Serum LDL-cholesterol (mmol/l)	3.12±0.90	2.85±0.73	
High HDL-cholesterol (%)	26.2	15.2	

50

【0037】

年齢、BMI、および血中脂質濃度に関するデータは、平均±SDで示した。喫煙率については、一日あたり10本以上を吸った場合を喫煙とした。高コレステロール血症については、血中総コレステロール濃度が5.69 mmol (220 mg/dL)以上の者とした。高トリグリセリド血症については、血清トリグリセリド値が1.65 mmol/L (150 mg/dL)以上の者とした。低HDLコレステロール血症については、血清HDLコレステロール値が1.04 mmol/L (40 mg/dL)未満の者とした。高LDLコレステロール血症については、血清LDLコレステロール値が3.64 mmol/L (140 mg/dL)以上の者とした。

【0038】

10

高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、高LDLコレステロール血症、Lコレステロール血症のリスク診断を行うために必要な因子を抽出するため、前記対象集団において検査した遺伝子多型結果を優性、劣性モデルとしてカイ二乗検定により評価し、さらに年齢、性別、BMI、喫煙状態を含む多項ロジスティック回帰分析を行った(詳細については後述する)。その結果、次に説明するように、脂質代謝異常に関するリスク診断を行えることが分かった。

【0039】

<脂質代謝異常のリスク診断システム>

表9 - 表12には、ステップワイズ変数増加法で各疾患の発生に有意(に関連した遺伝子多型群および他の背景因子(年齢、性別、BMI)に関する詳細を示した。これらの因子は独立したものであり、オッズ比の積(かけ算)により総合的な高血圧発症リスクを予測することができる。表には、左欄より順に、因子(Variable)、p値(P value)、オッズ比(95%信頼区間)(OR(95%CI))を示した。また、最下段には、従来の危険因子(Conventional risk factors)と、今回の研究で見出された遺伝因子(Genetic risk factors)のオッズ比を乗じた総合リスク(Total risk)を示した。

20

【0040】

【表 9】

Variable	Polymorphism	Dominant / Recessive	P value	OR (95%CI)	
Hypercholesterolemia					
Conventional risk factors				0.472~1.062	
Male			< 0.0001	0.535 (0.472~0.607)	
BMI			< 0.0001	1.042 (1.022~1.062)	
Genetic risk factors				0.168~97.935	
AGT	G-6A	Dominant	< 0.0001	1.423 (1.211~1.673)	
APOE	C4070T (Arg158Cys)	Dominant	< 0.0001	0.531 (0.409~0.689)	10
APOE	T3932C (Cys112Arg)	Dominant	0.001	1.292 (1.109~1.504)	
ABCA1	G1051A (Arg219Lys)	Recessive	0.025	0.846 (0.731~0.979)	
GJA4	C1019T (Pro319Ser)	Dominant	0.030	1.157 (1.014~1.319)	
ENPP1	A97C (Lys121Gln)	Recessive	0.020	0.380 (0.168~0.860)	
LIPC	G-250A	Recessive	0.007	0.814 (0.701~0.945)	
LTA	C804A (Thr26Asn)	Recessive	0.014	0.804 (0.676~0.956)	
SERPINE1	4G/5G at _668	Dominant	0.024	0.864 (0.761~0.980)	
ABCC8	G/A (Arg1273Arg)	Dominant	0.005	0.804 (0.689~0.937)	
CD14	C-159T	Recessive	0.025	1.171 (1.020~1.344)	
APOA5	T-1131C	Recessive	0.001	0.802 (0.706~0.911)	20
PDE4D	TAAA/- (3'-UTR)	Dominant	0.012	0.846 (0.742~0.964)	
EPHX2	G/A (Arg287Gln)	Dominant	0.007	1.193 (1.049~1.356)	
VAMP8	A/G	Recessive	0.012	1.248 (1.049~1.485)	
APOB	T/C (Val591Ala)	Dominant	0.008	2.256 (1.236~4.118)	
CETP	C/T in intron 1	Recessive	0.005	1.287 (1.081~1.532)	
Total risk				0.079~104.007	

【 0 0 4 1 】

【表 1 0】

Variable	Polymorphism	Dominant / Recessive	P value	OR (95%CI)	
Hypertriglyceridemia					
Conventional risk factors				0.981~1.601	
Male			< 0.0001	1.403 (1.229~1.601)	
BMI			< 0.0001	1.136 (1.115~1.158)	
Genetic risk factors				0.395~4.023	
APOC3	C1100T	Dominant	0.048	1.201 (1.001~1.441)	10
APOE	T3932C (Cys112Arg)	Recessive	0.008	2.221 (1.226~4.024)	
ITGB2	C1323T	Recessive	0.019	1.342 (1.049~1.717)	
LPL	C1595G (Ser447Stop)	Dominant	< 0.0001	0.682 (0.588~0.791)	
SERPINE1	4G/5G at _668	Recessive	0.014	1.237 (1.043~1.467)	
THBD	C2136T (Ala455Val)	Recessive	0.008	1.363 (1.086~1.712)	
MTP	G-493T	Recessive	0.012	0.594 (0.395~0.891)	
APOA5	T-1131C	Dominant	0.001	0.719 (0.595~0.869)	
MMP1	A-519G	Dominant	0.004	0.795 (0.681~0.929)	
PDE4D	C/T	Dominant	0.012	0.836 (0.726~0.961)	
APOA5	G553T (Gly185Cys)	Dominant	0.0001	1.422 (1.190~1.701)	20
PCSK9	A/G (Ile474Val)	Recessive	0.017	1.382 (1.060~1.802)	
ACAT2	A41G (Glu14Gly)	Recessive	0.001	0.564 (0.404~0.788)	
CYP7A1	A-204C	Dominant	0.002	0.801 (0.697~0.920)	
CYP3A5	A6986G in intron 3	Dominant	0.011	0.853 (0.755~0.964)	
Total risk				0.387~6.441	

【 0 0 4 2 】

【表 1 1】

Variable	Polymorphism	Dominant / Recessive	P value	OR (95%CI)
Low HDL-cholesterol				
Conventional risk factors				0.978~4.089
Male			< 0.0001	3.363 (2.766~4.089)
BMI			< 0.0001	1.100 (1.073~1.128)
Genetic risk factors				0.230~4.887
ADIPOQ	/T in intron 2 (SNP-27	Dominant	0.019	1.209 (1.031~1.418)
AGT	G-6A	Dominant	0.001	1.605 (1.221~2.109)
APOE	G-219T	Recessive	0.002	1.302 (1.102~1.538)
APOE	T3932C (Cys112Arg)	Dominant	0.008	1.298 (1.070~1.574)
LIPC	G-250A	Dominant	0.0003	1.465 (1.192~1.799)
LPL	C1595G (Ser447Stop)	Dominant	< 0.0001	0.652 (0.532~0.799)
SERPINE1	4G/5G at _668	Recessive	0.005	1.364 (1.099~1.693)
TNF	C-850T	Recessive	0.002	1.864 (1.258~2.764)
CETP	C-629A	Recessive	0.0002	0.706 (0.590~0.846)
CD14	C-159T	Dominant	0.030	1.248 (1.022~1.524)
UTS2	G/A (Ser89Asn)	Dominant	0.010	1.240 (1.054~1.458)
AGTR2	C3123A	Recessive	0.018	1.233 (1.036~1.467)
APOA5	T-1131C	Dominant	0.001	0.666 (0.525~0.844)
PSMA6	C-8G	Dominant	0.008	1.244 (1.058~1.462)
APOA5	A-3G	Recessive	0.040	1.834 (1.029~3.267)
APOB	C/T (Thr71Ile)	Dominant	0.001	1.431 (1.162~1.762)
APOA5	G553T (Gly185Cys)	Dominant	0.0003	1.524 (1.213~1.914)
ABCB1	T/G (Ser893Ala)	Recessive	0.010	0.745 (0.595~0.933)
Total risk				0.225~19.983

【 0 0 4 3 】

10

20

30

【表 1 2】

Variable	Polymorphism	Dominant / Recessive	P value	OR (95%CI)	
High LDL-cholesterol					
Conventional risk factors				0.632~1.044	
Male			< 0.0001	0.724 (0.632~0.830)	
Genetic risk factors				0.235~108.862	
AGT	G-6A	Dominant	0.001	1.418 (1.155~1.742)	
APOE	C4070T (Arg158Cys)	Dominant	< 0.0001	0.475 (0.352~0.641)	10
APOE	T3932C (Cys112Arg)	Dominant	< 0.0001	1.396 (1.189~1.640)	
FABP2	G2445A (Ala54Thr)	Dominant	0.031	1.163 (1.014~1.335)	
LPL	C1595G (Ser447Stop)	Recessive	0.044	0.480 (0.235~0.979)	
ABCC8	G/A (Arg1273Arg)	Dominant	0.020	0.821 (0.695~0.969)	
TNF	G-238A	Recessive	0.027	12.037 (1.331~108.862)	
THBS2	T/G (3' UTR)	Dominant	0.003	1.295 (1.091~1.537)	
AKAP10	A/G (Ile646Val)	Dominant	0.005	0.814 (0.706~0.939)	
P2RY12	T744C	Dominant	0.015	1.723 (1.110~2.675)	
AGTR2	C3123A	Dominant	< 0.0001	1.373 (1.174~1.605)	
CPB2	T/C (Ile347Thr)	Recessive	0.028	0.845 (0.728~0.982)	20
ADIPOR1	C/G	Recessive	0.014	1.418 (1.075~1.872)	
APOB	T/C (Val591Ala)	Dominant	0.015	2.301 (1.175~4.506)	
Total risk				0.149~113.652	

【 0 0 4 4 】

< 高コレステロール血症 >

多項ロジスティック回帰分析の結果、従来の危険因子としては性別とBMIが、遺伝因子としては、ABCA、ABCC8、AGT、APOA5、APOB、APOE、CD14、CETP、ENPP1、EPHX2、GJA4、LIPC、LTA、PDE4D、SERPINE1、VAMP8の各遺伝子多型が高コレステロール血症に関連した。従来の危険因子では最小オッズ比が0.472で最大オッズ比が1.062、遺伝因子では最小オッズ比が0.168で最大オッズ比が97.935であった。したがって、従来の危険因子と遺伝因子を総合すると、最小オッズ比が0.079で最大オッズ比が104.007であり、1316倍の差が認められた。

30

【 0 0 4 5 】

< 高トリグリセリド血症 >

多項ロジスティック回帰分析の結果、従来の危険因子としては性別とBMIが、遺伝因子としては、ACAT2、APOA5、APOC3、APOE、CYP3A5、CYP7A1、ITGB2、LPL、MMP1、MTP、PCSK9、PDE4D、SERPINE1、THBDの各遺伝子多型が高トリグリセリド血症に関連した。従来の危険因子では最小オッズ比が0.981で最大オッズ比が1.061、遺伝因子では最小オッズ比が0.395で最大オッズ比が4.023であった。したがって、従来の危険因子と遺伝因子を総合すると、最小オッズ比が0.387で最大オッズ比が4.268であり、11倍の差が認められた。

40

【 0 0 4 6 】

< 低HDLコレステロール血症 >

多項ロジスティック回帰分析の結果、従来の危険因子としては性別とBMIが、遺伝因子としては、ABCB1、ADIPOQ、AGT、AGTR2、APOA5、APOB、APOE、CD14、CETP、LIPC、LPL、PSMA6、SERPINE1、TNF、UTS2の各遺伝子多型が高トリグリセリド血症に関連した。従来の危険因子では最小オッズ比が0.978で最大オッズ比が4.089、遺伝因子では最小オッズ比が0.

50

230で最大オッズ比が4.887であった。したがって、従来の危険因子と遺伝因子を総合すると、最小オッズ比が0.225で最大オッズ比が19.983であり、88倍の差が認められた。

【0047】

<高LDLコレステロール血症>

多項ロジスティック回帰分析の結果、従来の危険因子としては性別が、遺伝因子としては、ABCC8、ADIPO1、AGT、AGTR2、AKAP10、APOB、APOE、CPB2、FABP2、LPL、P2RY12、THBS2、TNFの各遺伝子多型が高LDLコレステロール血症に関連した。従来の危険因子では最小オッズ比が0.632で最大オッズ比が1.044、遺伝因子では最小オッズ比が0.235で最大オッズ比が108.862であった。したがって、従来の危険因子と遺伝因子を総合すると、最小オッズ比が0.149で最大オッズ比が113.652であり、762倍の差が認められた。

10

【0048】

ステップワイズ変数増加法で各疾患の発生に有意に関連した遺伝子多型群および性別、BMIに関しては、再度強制投入法による多項ロジスティック回帰分析を行い、リスク診断を行うために必要な因子を抽出した(後の表25-表28に示す)。

【0049】

本研究成果の臨床的な意義について以下に述べる。病院、クリニックまたは健診センターにおいて希望者に対して従来の危険因子と今回の遺伝因子に関する検査を行い、脂質代謝異常の発症リスクの予測を行う。多項ロジスティック回帰分析により疾患の発症に関連が認められた遺伝因子および他の交絡因子(性別、BMI)についての検査結果から、受診者の発症確率のロジットを推定し、その分布からリスクの程度を3段階以上(例えば、5段階)に分ける。コントロール群のリスク値の大きい順に全体を5%、20%、50%、20%、5%に区分し、リスク値の最も大きい5%の群をリスクが高い群、次の20%の群をリスクがやや高い群、次の50%の群を平均的リスクの群、次の20%の群をリスクがやや低い群、リスク値が最も小さい5%の群をリスクが低い群とする。

20

実際に本研究における高コレステロール血症の分布は、リスクが高い群は11.8%(コントロール群は4.9%)、リスクがやや高い群は31.2%(コントロール群は21.3%)、平均的リスクの群は44.2%(コントロール群は49.2%)、リスクがやや低い群は10.8%(コントロール群は19.3%)、リスクが低い群は1.1%(コントロール群は5.3%)であった。高トリグリセリド血症の分布は、リスクが高い群は11.9%(コントロール群は4.7%)、リスクがやや高い群は46.5%(コントロール群は20.6%)、平均的リスクの群は44.3%(コントロール群は52.2%)、リスクがやや低い群は10.0%(コントロール群は18.5%)、リスクが低い群は1.4%(コントロール群は5.0%)であった。低HDLコレステロール血症の分布は、リスクが高い群は20.1%(コントロール群は5.0%)、リスクがやや高い群は39.2%(コントロール群は20.0%)、平均的リスクの群は34.8%(コントロール群は50.0%)、リスクがやや低い群は5.5%(コントロール群は19.9%)、リスクが低い群は0.5%(コントロール群は5.0%)であった。高LDLコレステロール血症の分布は、リスクが高い群は4.3%(コントロール群は4.3%)、リスクがやや高い群は23.2%(コントロール群は20.7%)、平均的リスクの群は49.5%(コントロール群は50.5%)、リスクがやや低い群は18.2%(コントロール群は19.7%)、リスクが低い群は4.8%(コントロール群は4.9%)であった。

30

40

【0050】

結果については、医師等の有資格者の判断を含めてカウンセリングを行い、とりわけ高リスク群またはやや高リスク群に属する場合には生活習慣の改善(禁煙・飲酒の減量・食事療法即ちカロリー制限・運動療法・ストレス解消・睡眠不足解消など)を行うことにより脂質代謝異常群の一次・二次予防を積極的に推進する。特に多量の飲酒、高カロリー・高脂肪食、運動不足などの生活習慣は、一般的に脂質代謝異常群の原因と考えられている

50

ため、遺伝的に脂質代謝異常のリスクが平均より高いと予測された場合は、生活習慣の改善により脂質代謝異常のリスクを減少させるようにクライアントに説明する。特に脂質代謝異常の家族歴のある人への適用が有効である。本システムにより脂質代謝異常のオーダーメイド予防が可能になり、脂質代謝異常に起因する種々の疾患、即ち心筋梗塞、脳梗塞、腎臓病、閉塞性動脈硬化症などの予防につながる。ひいては、高齢者の健康寿命延長・QOL向上・ねたきり防止や今後の医療費削減などにつながり、医学的・社会的に大きく貢献できる。

【0051】

<リスク判断システム>

次に、上記リスク判断システムを開発するに至った統計解析の結果について説明する。

カイ二乗検定により、高コレステロール血症で47個、高トリグリセリド血症で38個、低HDLコレステロール血症で61個、高LDLコレステロール血症で29個の遺伝モデルが疾患との関連を示した($p < 0.05$)。詳細を表13 - 表16に示した。表においては、左欄より順に、遺伝子表記(Gene symbol)、遺伝モデル(Dominant/Recessive)、および危険率(p)を示している。

【0052】

【表 1 3】

Polymorphisms related ($P < 0.05$) to hypercholesterolemia evaluated by the chi-square test.

Gene Symbol	Dominant / Recessive	Polymorphism	p	
ACE	Dominant	TT+AT	0.033253498	
ACE	Recessive	TT	0.0188	
AGT	Dominant	AA+GA	0.0001	
AGT	Recessive	AA	0.0292	
APOE	Dominant	TT+CT	0.0000	10
APOE	Dominant	TT+GT	0.0116	
APOE	Recessive	TT	0.0143	
APOE	Dominant	CC+TC	0.0002	
ABCA1	Dominant	AA+GA	0.0405	
ABCA1	Recessive	AA	0.0156	
F7	Recessive	AA	0.0490	
GJA4	Dominant	TT+AT	0.0440	
ENPP1	Recessive	CC	0.0262	
LIPC	Dominant	AA+GA	0.0180	
LIPC	Recessive	AA	0.0130	
INS	Dominant	AA+TA	0.0488	20
LTA	Recessive	AA	0.0052	
SERPINE1	Dominant	5G5G+4G5G	0.0358	
ABCC8	Dominant	AA+GA	0.0071	
TNF	Recessive	AA	0.0242	
AGTR2	Recessive	AA	0.0015	
CETP	Recessive	AA	0.0059	
CD14	Recessive	TT	0.0284	
AGTR2	Dominant	AA+CA	0.0030	
APOA5	Recessive	CC	0.0029	
PDE4D	Dominant	-- +TAAA -	0.0052	
CCL5	Recessive	AA	0.0302	30
EPHX2	Dominant	AA+GA	0.0145	
SLC26A8	Dominant	GG+AG	0.0455	
CPB2	Recessive	CC	0.0424	
CD40LG	Dominant	GG+AG	0.0358	
CD40LG	Recessive	GG	0.0010	
IRAK1	Dominant	TT+CT	0.0178	
IRAK1	Recessive	TT	0.0113	
IRAK1	Dominant	TT+CT	0.0056	
IRAK1	Recessive	TT	0.0195	
IRAK1	Dominant	CC+AC	0.0084	
IRAK1	Recessive	CC	0.0143	40
MMP1	Recessive	GG	0.0278	
VAMP8	Recessive	GG	0.0208	
LIPC	Dominant	TT+CT	0.0306	
LIPC	Recessive	TT	0.0219	
APOA5	Recessive	GG	0.0026	
APOB	Dominant	CC+TC	0.0064	
CETP	Dominant	TT+CT	0.0184	
CETP	Recessive	TT	0.0013	
CYP7A1	Dominant	CC+AC	0.0277	

【表 1 4】

Polymorphisms related ($P < 0.05$) to hypertriglyceridemia evaluated by the chi-square test.

Gene Symbol	Dominant / Recessive	Polymorphism	p
ACSM3	Dominant	GG+AG	0.0209
ADIPOQ	Dominant	TT+GT	0.0454
APOC3	Dominant	TT+CT	0.0000
APOC3	Recessive	TT	0.0001
APOE	Dominant	CC+TC	0.0406
APOE	Recessive	CC	0.0047
ADRB1	Dominant	CC+GC	0.0428
ITGB2	Recessive	TT	0.0179
F7	Dominant	AA+GA	0.0404
GNB3	Recessive	TT	0.0283
LPL	Dominant	GG+CG	0.0000
SERPINE1	Recessive	5G5G	0.0220
THBD	Recessive	TT	0.0042
AGTR2	Recessive	AA	0.0339
MTP	Dominant	TT+GT	0.0485
MTP	Recessive	TT	0.0022
APOA1	Dominant	CC+TC	0.0049
APOA1	Recessive	CC	0.0000
APOA5	Dominant	CC+TC	0.0000
APOA5	Recessive	CC	0.0000
MMP1	Dominant	GG+AG	0.0102
PDE4D	Recessive	TT	0.0404
ZNF627	Recessive	GG	0.0277
ROCK2	Recessive	AA	0.0426
PCSK9	Dominant	AA+GA	0.0380
APOA5	Dominant	GG+AG	0.0000
APOA5	Recessive	GG	0.0000
APOB	Dominant	TT+CT	0.0329
APOA5	Dominant	TT+GT	0.0000
APOA5	Recessive	TT	0.0005
PCSK9	Recessive	GG	0.0228
SREBF2	Recessive	CC	0.0339
ACAT2	Dominant	GG+AG	0.0087
ACAT2	Recessive	GG	0.0048
ACAT2	Dominant	TT+CT	0.0069
ACAT2	Recessive	TT	0.0212
CYP7A1	Dominant	CC+AC	0.0160
CYP3A5	Dominant	GG+AG	0.0073

【 0 0 5 4 】

【表 1 5】

Polymorphisms related ($P < 0.05$) to low HDL-cholesterol evaluated by the chi-square test.

Gene Symbol	Dominant / Recessive	Polymorphism	p	
ACSM3	Dominant	GG+AG	0.0347	
ADIPOQ	Dominant	TT+GT	0.0331	
AGT	Dominant	AA+GA	0.0000	
AGT	Recessive	AA	0.0000	
APOC3	Recessive	TT	0.0124	
APOE	Dominant	TT+CT	0.0192	
APOE	Dominant	TT+GT	0.0000	
APOE	Recessive	TT	0.0000	10
APOE	Dominant	CC+TC	0.0123	
CCR2	Dominant	AA+GA	0.0118	
CCR2	Recessive	AA	0.0000	
CETP	Recessive	GG+AG	0.0325	
F7	Dominant	AA+GA	0.0130	
NOS3	Recessive	CC	0.0016	
LIPC	Dominant	AA+GA	0.0000	
LIPC	Recessive	AA	0.0000	
LPL	Dominant	GG+CG	0.0001	
SERPINE1	Recessive	5G5G	0.0451	
PTGIS	Recessive	AA	0.0310	
THBD	Dominant	TT+CT	0.0161	
THBD	Recessive	TT	0.0457	20
TNF	Recessive	TT	0.0038	
AGTR2	Dominant	AA+GA	0.0001	
AGTR2	Recessive	AA	0.0000	
ADIPOQ	Dominant	GG+CG	0.0162	
CETP	Recessive	AA	0.0009	
THBS2	Dominant	GG+TG	0.0360	
OLR1	Recessive	CC	0.0266	
CD14	Dominant	TT+CT	0.0150	
UTS2	Dominant	AA	0.0062	
AGTR2	Dominant	AA+CA	0.0002	
AGTR2	Recessive	AA	0.0000	
APOA1	Recessive	CC	0.0072	
APOA5	Dominant	CC+TC	0.0000	
APOA5	Recessive	CC	0.0000	30
CD36	Dominant	CC+GC	0.0318	
HNF4A	Recessive	GG	0.0186	
CD40LG	Recessive	GG	0.0000	
IRAK1	Dominant	TT+CT	0.0001	
IRAK1	Recessive	TT	0.0058	
IRAK1	Dominant	TT+CT	0.0000	
IRAK1	Recessive	TT	0.0202	
IRAK1	Dominant	CC+AC	0.0001	
IRAK1	Recessive	CC	0.0079	
HNRPUL1	Dominant	TT+AT	0.0176	
PSMA6	Dominant	GG+CG	0.0380	
LIPC	Dominant	TT+CT	0.0000	
LIPC	Recessive	TT	0.0000	
APOA5	Dominant	GG+AG	0.0000	40
APOA5	Recessive	GG	0.0000	
APOB	Dominant	TT+CT	0.0001	
APOB	Dominant	CC+TC	0.0073	
APOB	Recessive	CC	0.0274	
ACAT1	Recessive	AA+GA	0.0387	
APOA5	Dominant	TT+GT	0.0000	
APOA5	Recessive	TT	0.0000	
GSBS	Recessive	CC	0.0451	
ABCC6	Recessive	AA	0.0293	
ABCB1	Recessive	GG	0.0287	
CETP	Recessive	TT	0.0071	
CYP3A4	Dominant	GG+AG	0.0097	

【表 1 6】

Polymorphisms related ($P < 0.05$) to high LDL-cholesterol evaluated by the chi-square test.

Gene Symbol	Dominant / Recessive	Polymorphism	p	
ACE	Dominant	TT+AT	0.0359	
AGT	Dominant	AA+GA	0.0000	
AGT	Recessive	AA	0.0000	
APOE	Dominant	TT+CT	0.0000	
APOE	Dominant	TT+GT	0.0000	10
APOE	Recessive	TT	0.0000	
APOE	Dominant	CC+TC	0.0000	
ABCA1	Dominant	AA+GA	0.0472	
CCR2	Recessive	AA	0.0027	
FABP2	Dominant	AA+GA	0.0473	
LPL	Recessive	GG	0.0252	
THPO	Dominant	GG+AG	0.0210	
TNF	Recessive	AA	0.0117	
RECQL2	Dominant	CC+TC	0.0153	
AGTR2	Dominant	AA+GA	0.0225	
INSR	Dominant	AA+CA	0.0488	20
THBS2	Dominant	GG+TG	0.0011	
AKAP10	Dominant	GG+AG	0.0076	
AKAP10	Recessive	GG	0.0266	
P2RY12	Dominant	CC+TC	0.0237	
AGTR2	Dominant	AA+CA	0.0000	
AGTR2	Recessive	AA	0.0000	
CD36	Dominant	CC+GC	0.0394	
CPB2	Recessive	CC	0.0174	
ADIPOR1	Recessive	GG	0.0099	
CD40LG	Recessive	GG	0.0255	30
TNFRSF4	Dominant	GG+AG	0.0242	
APOB	Dominant	CC+TC	0.0202	
ABCC6	Dominant	AA+GA	0.0373	

【 0 0 5 6 】

これらの遺伝モデルについては、各疾患との関連について更に詳細に分析した。年齢、性別を補正した多項ロジスティック回帰分析を行ったところ、次の多型において、各疾患の発生に有意に関連した ($p < 0.05$)。詳細を表 17 - 表 20 に示した。表においては、左欄より順に、遺伝子表記 (Gene symbol)、多型 (Polymorphism)、遺伝モデル (Dominant/Recessive)、危険率 (p)、オッズ比 (OR)、95%信頼区間 (95% CI) をそれぞれ示している。

【 0 0 5 7 】

【表 17】

Logistic regression analysis of polymorphisms related to Dyslipidemia.

Gene Symbol	Polymorphism	Dominant / Recessive	P value	OR (95%CI)
Hypercholesterolemia				
ACE	TT+AT	Dominant	0.037	1.142 (1.008~1.293)
ACE	TT	Recessive	0.024	1.221 (1.026~1.452)
AGT	AA+GA	Dominant	< 0.0001	1.391 (1.183~1.634)
AGT	AA	Recessive	0.017	1.162 (1.027~1.315)
APOE	TT+CT	Dominant	< 0.0001	0.511 (0.396~0.660)
APOE	TT+GT	Dominant	0.010	1.239 (1.053~1.457)
APOE	TT	Recessive	0.008	1.185 (1.046~1.342)
APOE	CC+TC	Dominant	< 0.0001	1.350 (1.164~1.566)
ABCA1	AA+GA	Dominant	0.036	0.863 (0.752~0.990)
ABCA1	AA	Recessive	0.013	0.836 (0.725~0.963)
F7	AA	Recessive	0.041	2.259 (1.034~4.936)
GJA4	TT+AT	Dominant	0.047	1.138 (1.002~1.293)
ENPP1	CC	Recessive	0.022	0.390 (0.175~0.873)
LIPC	AA+GA	Dominant	0.015	0.845 (0.737~0.967)
LIPC	AA	Recessive	0.006	0.816 (0.706~0.944)
LTA	AA	Recessive	0.009	0.798 (0.674~0.945)
SERPINE1	5G5G+4G5G	Dominant	0.031	0.873 (0.772~0.988)
ABCC8	AA+GA	Dominant	0.004	0.802 (0.691~0.932)
TNF	AA	Recessive	0.026	12.163 (1.346~109.872)
CETP	AA	Recessive	0.005	1.205 (1.057~1.374)
CD14	TT	Recessive	0.021	1.171 (1.025~1.339)
APOA5	CC	Recessive	0.001	0.819 (0.723~0.926)
PDE4D	-- +TAAA -	Dominant	0.005	0.834 (0.735~0.947)
EPHX2	AA+GA	Dominant	0.010	1.179 (1.041~1.335)
CPB2	CC	Recessive	0.042	0.868 (0.757~0.995)
MMP1	GG	Recessive	0.048	1.712 (1.005~2.915)
VAMP8	GG	Recessive	0.018	1.225 (1.036~1.449)
LIPC	TT+CT	Dominant	0.016	1.196 (1.034~1.383)
LIPC	TT	Recessive	0.019	1.178 (1.027~1.352)
APOA5	GG	Recessive	0.002	0.819 (0.724~0.927)
APOB	CC+TC	Dominant	0.011	2.103 (1.182~3.741)
CETP	TT+CT	Dominant	0.019	1.165 (1.025~1.323)
CETP	TT	Recessive	0.001	1.307 (1.114~1.533)
CYP7A1	CC+AC	Dominant	0.048	0.870 (0.757~0.999)

10

20

30

40

【 0 0 5 8 】

【表 1 8】

Gene Symbol	Polymorphism	Dominant / Recessive	P value	OR (95%CI)
Hypertriglyceridemia				
ACSM3	GG+AG	Dominant	0.027	0.703 (0.514~0.960)
ADIPOQ	TT+GT	Dominant	0.041	0.888 (0.792~0.995)
APOC3	TT+CT	Dominant	< 0.0001	1.592 (1.354~1.871)
APOC3	TT	Recessive	0.0001	1.265 (1.123~1.424)
APOE	CC+TC	Dominant	0.039	1.161 (1.007~1.339)
APOE	CC	Recessive	0.004	2.291 (1.312~3.999)
ADRB1	CC+GC	Dominant	0.050	0.751 (0.564~0.999)
ITGB2	TT	Recessive	0.017	1.327 (1.052~1.673)
GNB3	TT	Recessive	0.026	1.161 (1.018~1.324)
LPL	GG+CG	Dominant	< 0.0001	0.728 (0.633~0.837)
SERPINE1	5G5G	Recessive	0.019	1.212 (1.032~1.423)
THBD	TT	Recessive	0.005	1.358 (1.096~1.683)
MTP	TT	Recessive	0.005	0.577 (0.393~0.847)
APOA1	CC+TC	Dominant	0.006	1.480 (1.117~1.962)
APOA1	CC	Recessive	< 0.0001	1.343 (1.192~1.513)
APOA5	CC+TC	Dominant	< 0.0001	0.532 (0.450~0.630)
APOA5	CC	Recessive	< 0.0001	0.524 (0.466~0.590)
MMP1	GG+AG	Dominant	0.011	0.827 (0.714~0.958)
PDE4D	TT	Recessive	0.039	0.871 (0.763~0.993)
ZNF627	GG	Recessive	0.040	1.669 (1.025~2.719)
ROCK2	AA	Recessive	0.042	1.131 (1.005~1.274)
PCSK9	AA+GA	Dominant	0.032	0.650 (0.439~0.963)
APOA5	GG+AG	Dominant	< 0.0001	0.553 (0.468~0.655)
APOA5	GG	Recessive	< 0.0001	0.541 (0.481~0.609)
APOA5	TT+GT	Dominant	< 0.0001	1.856 (1.584~2.173)
APOA5	TT	Recessive	0.001	3.073 (1.582~5.970)
PCSK9	GG	Recessive	0.018	1.358 (1.054~1.749)
SREBF2	CC	Recessive	0.029	1.214 (1.020~1.445)
ACAT2	GG+AG	Dominant	0.009	0.855 (0.760~0.963)
ACAT2	GG	Recessive	0.004	0.634 (0.466~0.861)
ACAT2	TT+CT	Dominant	0.009	0.854 (0.758~0.961)
ACAT2	TT	Recessive	0.022	0.832 (0.711~0.973)
CYP7A1	CC+AC	Dominant	0.010	0.842 (0.739~0.959)
CYP3A5	GG+AG	Dominant	0.006	0.852 (0.759~0.956)

10

20

30

【 0 0 5 9 】

【表 19】

Gene Symbol	Polymorphism	Dominant / Recessive	P value	OR (95%CI)	
Low HDL-cholesterol					
ADIPOQ	TT+GT	Dominant	0.039	1.168 (1.008~1.354)	
AGT	AA+GA	Dominant	< 0.0001	2.088 (1.669~2.611)	
AGT	AA	Recessive	< 0.0001	1.472 (1.266~1.712)	
APOC3	TT	Recessive	0.012	1.217 (1.045~1.416)	
APOE	TT+GT	Dominant	< 0.0001	1.578 (1.274~1.955)	
APOE	TT	Recessive	< 0.0001	1.463 (1.260~1.698)	10
APOE	CC+TC	Dominant	0.011	1.260 (1.054~1.507)	
CCR2	AA+GA	Dominant	0.036	0.851 (0.732~0.990)	
CCR2	AA	Recessive	< 0.0001	0.640 (0.520~0.788)	
CETP	GG+AG	Recessive	0.041	0.838 (0.707~0.993)	
F7	AA+GA	Dominant	0.024	0.759 (0.598~0.964)	
NOS3	CC	Recessive	0.002	2.336 (1.369~3.985)	
LIPC	AA+GA	Dominant	< 0.0001	1.590 (1.327~1.905)	
LIPC	AA	Recessive	< 0.0001	1.505 (1.278~1.773)	
LPL	GG+CG	Dominant	0.0004	0.713 (0.591~0.860)	
SERPINE1	5G5G	Recessive	0.028	1.254 (1.024~1.536)	20
THBD	TT+CT	Dominant	0.018	1.195 (1.031~1.386)	
TNF	TT	Recessive	0.004	1.727 (1.192~2.502)	
ADIPOQ	GG+CG	Dominant	0.018	1.195 (1.031~1.385)	
CETP	AA	Recessive	0.001	0.746 (0.631~0.882)	
THBS2	GG+TG	Dominant	0.026	1.239 (1.026~1.496)	
CD14	TT+CT	Dominant	0.027	1.232 (1.024~1.482)	
UTS2	AA	Dominant	0.009	1.221 (1.050~1.419)	
AGTR2	AA+CA	Dominant	< 0.0001	1.504 (1.289~1.755)	
AGTR2	AA	Recessive	< 0.0001	1.538 (1.320~1.791)	
APOA1	CC	Recessive	0.017	1.207 (1.034~1.409)	30
APOA5	CC+TC	Dominant	< 0.0001	0.540 (0.441~0.661)	
APOA5	CC	Recessive	< 0.0001	0.622 (0.533~0.726)	
CD36	CC+GC	Dominant	0.043	0.830 (0.692~0.994)	
HNF4A	GG	Recessive	0.017	1.204 (1.034~1.401)	
HNRPUL1	TT+AT	Dominant	0.029	0.834 (0.709~0.982)	
PSMA6	GG+CG	Dominant	0.014	1.208 (1.040~1.403)	
LIPC	TT+CT	Dominant	< 0.0001	0.685 (0.581~0.807)	
LIPC	TT	Recessive	< 0.0001	0.643 (0.535~0.772)	
APOA5	GG+AG	Dominant	< 0.0001	0.551 (0.449~0.675)	
APOA5	GG	Recessive	< 0.0001	0.649 (0.557~0.757)	40
APOB	TT+CT	Dominant	0.001	1.381 (1.138~1.675)	
APOB	CC+TC	Dominant	0.017	0.562 (0.350~0.903)	
APOA5	TT+GT	Dominant	< 0.0001	1.821 (1.504~2.205)	
APOA5	TT	Recessive	< 0.0001	3.994 (2.028~7.866)	
ABCB1	GG	Recessive	0.014	0.769 (0.623~0.948)	
CETP	TT	Recessive	0.006	0.741 (0.598~0.918)	
CYP3A4	GG+AG	Dominant	0.050	0.135 (0.018~0.997)	

【表 2 0】

Gene Symbol	Polymorphism	Dominant / Recessive	P value	OR (95%CI)	
High LDL-cholesterol					
ACE	TT+AT	Dominant	0.039	1.152 (1.007~1.318)	
AGT	AA+GA	Dominant	< 0.0001	1.749 (1.457~2.100)	
AGT	AA	Recessive	< 0.0001	1.343 (1.175~1.534)	
APOE	TT+CT	Dominant	< 0.0001	0.451 (0.336~0.605)	
APOE	TT+GT	Dominant	< 0.0001	1.460 (1.218~1.750)	
APOE	TT	Recessive	< 0.0001	1.370 (1.199~1.565)	10
APOE	CC+TC	Dominant	< 0.0001	1.448 (1.238~1.694)	
ABCA1	AA+GA	Dominant	0.044	0.859 (0.741~0.996)	
CCR2	AA	Recessive	0.006	0.788 (0.664~0.935)	
FABP2	AA+GA	Dominant	0.036	1.154 (1.010~1.318)	
LPL	GG	Recessive	0.027	0.453 (0.225~0.915)	
THPO	GG+AG	Dominant	0.014	0.817 (0.696~0.961)	
TNF	AA	Recessive	0.017	14.458 (1.608~130.028)	
RECQL2	CC+TC	Dominant	0.017	0.790 (0.652~0.958)	
THBS2	GG+TG	Dominant	0.001	1.332 (1.128~1.573)	
AKAP10	GG+AG	Dominant	0.007	0.827 (0.720~0.950)	20
AKAP10	GG	Recessive	0.034	0.677 (0.472~0.971)	
P2RY12	CC+TC	Dominant	0.030	1.603 (1.048~2.452)	
AGTR2	AA+CA	Dominant	< 0.0001	1.573 (1.370~1.806)	
AGTR2	AA	Recessive	< 0.0001	1.435 (1.250~1.647)	
CD36	CC+GC	Dominant	0.041	0.845 (0.719~0.993)	
CPB2	CC	Recessive	0.017	0.838 (0.724~0.969)	
ADIPOR1	GG	Recessive	0.005	1.468 (1.123~1.920)	
TNFRSF4	GG+AG	Dominant	0.021	0.612 (0.403~0.930)	
APOB	CC+TC	Dominant	0.027	2.053 (1.086~3.882)	
ABCC6	AA+GA	Dominant	0.027	0.850 (0.736~0.981)	30

【 0 0 6 1】

次に、各疾患に対する遺伝子型、年齢、性別に加え、背景因子としてさらにBMI、喫煙状況の影響について、ステップワイズ変数増加法により解析した。

対象の選択基準は組み入れ規準 (inclusion criteria) を 0.25 とし、除外規準 (external validity) を 0.1 とした。結果を表 2 1 - 表 2 4 に示す。表中には、左欄より順に、因子 (Variable)、多型 (Polymorphism)、遺伝モデル (Dominant/Recessive)、p 値 (p value)、オッズ比 (OR)、95% 信頼区間 (95% CI) をそれぞれ示している。

【 0 0 6 2】

【表 2 1】

Logistic regression analysis by the step wise variable increase method

inclusion criteria : 0.25

external validity : 0.01

Gene Symbol	Polymorphism	Dominant / Recessive	P value	OR (95%CI)	
Hypercholesterolemia					
Male			< 0.0001	0.535 (0.472~0.607)	
BMI			< 0.0001	1.042 (1.022~1.062)	
ACE	TT+AT	Dominant	0.091	1.124 (0.982~1.288)	
ACE	TT	Recessive	0.084	1.181 (0.978~1.426)	10
AGT	AA+GA	Dominant	< 0.0001	1.423 (1.211~1.673)	
APOE	TT+AT	Dominant	< 0.0001	0.531 (0.409~0.689)	
APOE	CC+TC	Dominant	0.001	1.292 (1.109~1.504)	
ABCA1	AA	Recessive	0.025	0.846 (0.731~0.979)	
F7	AA	Recessive	0.049	2.224 (1.003~4.930)	
GJA4	TT+CT	Dominant	0.030	1.157 (1.014~1.319)	
ENPP1	CC	Recessive	0.020	0.380 (0.168~0.860)	
LIPC	AA	Recessive	0.007	0.814 (0.701~0.945)	
LTA	AA	Recessive	0.014	0.804 (0.676~0.956)	
PAI1	5G5G+4G5G	Dominant	0.024	0.864 (0.761~0.980)	
ABCC8	AA+GA	Dominant	0.005	0.804 (0.689~0.937)	20
TNF	AA	Recessive	0.036	10.684 (1.165~97.936)	
CD14	TT	Recessive	0.025	1.171 (1.020~1.344)	
APOA5	CC	Recessive	0.001	0.802 (0.706~0.911)	
PDE4D	-- +TAAA-	Dominant	0.012	0.846 (0.742~0.964)	
EPHX2	AA+GA	Dominant	0.007	1.193 (1.049~1.356)	
CPB2	CC	Recessive	0.084	0.884 (0.768~1.017)	
MMP1	GG	Recessive	0.083	1.632 (0.938~2.842)	
VAMP8	GG	Recessive	0.012	1.248 (1.049~1.485)	
APOB	CC+TC	Dominant	0.008	2.256 (1.236~4.118)	
CETP	TT+CT	Dominant	0.088	1.129 (0.982~1.298)	
CETP	TT	Recessive	0.005	1.287 (1.081~1.532)	
CYP7A1	CC+AC	Dominant	0.050	0.867 (0.753~1.000)	30

【 0 0 6 3 】

【表 2 2】

Gene Symbol	Polymorphism	Dominant / Recessive	P value	OR (95%CI)
Hypertriglyceridemia				
Male			< 0.0001	1.403 (1.229~1.601)
BMI			< 0.0001	1.136 (1.115~1.158)
smoker			0.087	1.145 (0.981~1.338)
ACSM3	GG+AG	Dominant	0.106	0.763 (0.550~1.059)
APOC3	TT+CT	Dominant	0.048	1.201 (1.001~1.441)
APOE	CC	Recessive	0.008	2.221 (1.226~4.024)
APOE	CC+TC	Dominant	0.119	1.130 (0.969~1.318)
ADRB1	CC+GC	Dominant	0.049	0.734 (0.540~0.998)
ITGB2	TT	Recessive	0.019	1.342 (1.049~1.717)
GNB3	TT	Recessive	0.034	1.163 (1.011~1.336)
LPL	GG+CG	Dominant	< 0.0001	0.682 (0.588~0.791)
PAI1	5G5G	Recessive	0.014	1.237 (1.043~1.467)
THBD	TT	Recessive	0.008	1.363 (1.086~1.712)
MTP	TT	Recessive	0.012	0.594 (0.395~0.891)
APOA5	CC	Recessive	< 0.0001	0.628 (0.543~0.725)
APOA5	CC+TC	Dominant	0.001	0.719 (0.595~0.869)
MMP1	GG+AG	Dominant	0.004	0.795 (0.681~0.929)
PDE4D	TT+CT	Dominant	0.012	0.836 (0.726~0.961)
ZNF627	GG	Recessive	0.038	1.728 (1.031~2.896)
ROCK2	AA	Recessive	0.039	1.141 (1.006~1.294)
APOA5	TT+GT	Dominant	0.0001	1.422 (1.190~1.701)
PCSK9	GG	Recessive	0.017	1.382 (1.060~1.802)
SREBF2	CC	Recessive	0.056	1.198 (0.995~1.442)
ACAT2	GG	Recessive	0.001	0.564 (0.404~0.788)
ACAT2	TT+CT	Dominant	0.072	0.890 (0.784~1.011)
CYP7A1	CC+AC	Dominant	0.002	0.801 (0.697~0.920)
CYP3A5	GG+AG	Dominant	0.011	0.853 (0.755~0.964)

【 0 0 6 4 】

【表 2 3】

Gene Symbol	Polymorphism	Dominant / Recessive	P value	OR (95%CI)	
Low HDL-cholesterol					
Age			0.036	1.009 (1.001~1.017)	
Male			< 0.0001	3.363 (2.766~4.089)	
BMI			< 0.0001	1.100 (1.073~1.128)	
smoker			0.083	1.184 (0.978~1.433)	
ADIPOQ	TT+GT	Dominant	0.019	1.209 (1.031~1.418)	
AGT	AA+GA	Dominant	0.001	1.605 (1.221~2.109)	
AGT	AA	Recessive	0.170	1.137 (0.947~1.365)	10
APOE	TT	Recessive	0.002	1.302 (1.102~1.538)	
APOE	CC+TC	Dominant	0.008	1.298 (1.070~1.574)	
CCR2	AA	Recessive	0.097	0.821 (0.650~1.036)	
F7	AA+GA	Dominant	0.069	0.788 (0.609~1.019)	
NOS3	CC	Recessive	0.038	1.878 (1.036~3.405)	
LIPC	AA+GA	Dominant	0.0003	1.465 (1.192~1.799)	
LIPC	AA	Recessive	0.001	1.375 (1.141~1.656)	
LPL	GG+CG	Dominant	< 0.0001	0.652 (0.532~0.799)	
PAI1	5G5G	Recessive	0.005	1.364 (1.099~1.693)	
THBD	TT+CT	Dominant	0.033	1.189 (1.014~1.394)	
TNF	TT	Recessive	0.002	1.864 (1.258~2.764)	20
ADIPOQ	GG+CG	Dominant	0.080	1.154 (0.983~1.354)	
CETP	AA	Recessive	0.0002	0.706 (0.590~0.846)	
THBS2	GG+TG	Dominant	0.064	1.213 (0.989~1.488)	
CD14	TT+CT	Dominant	0.030	1.248 (1.022~1.524)	
UTS2	AA+GA	Dominant	0.010	1.240 (1.054~1.458)	
AGTR2	AA	Recessive	0.018	1.233 (1.036~1.467)	
APOA5	CC+TC	Dominant	0.001	0.666 (0.525~0.844)	
APOA5	CC	Recessive	0.002	0.410 (0.230~0.730)	
CD36	CC+GC	Dominant	0.036	0.812 (0.668~0.987)	
HNRPUL1	TT+AT	Dominant	0.040	0.833 (0.699~0.992)	
PSMA6	GG+CG	Dominant	0.008	1.244 (1.058~1.462)	
APOA5	GG	Recessive	0.040	1.834 (1.029~3.267)	30
APOB	TT+CT	Dominant	0.001	1.431 (1.162~1.762)	
APOA5	TT+GT	Dominant	0.0003	1.524 (1.213~1.914)	
APOA5	TT	Recessive	0.039	2.258 (1.043~4.887)	
ABCB1	GG	Recessive	0.010	0.745 (0.595~0.933)	

【 0 0 6 5 】

【表 2 4】

Gene Symbol	Polymorphism	Dominant / Recessive	P value	OR (95%CI)	
High LDL-cholesterol					
Age			0.130	0.995 (0.988~1.002)	
Male			<0.0001	0.724 (0.632~0.830)	
BMI			0.035	1.022 (1.002~1.044)	
ACE	A-240 T	Dominant	0.034	1.162 (1.012~1.334)	
AGT	G-6A	Dominant	0.001	1.418 (1.155~1.742)	
APOE	C4070T (Arg158Cys)	Dominant	<0.0001	0.475 (0.352~0.641)	10
APOE	T3932C (Cys112Arg)	Dominant	<0.0001	1.396 (1.189~1.640)	
ABCA1	G1051A (Arg219Lys)	Dominant	0.062	0.865 (0.743~1.007)	
FABP2	G2445A (Ala54Thr)	Dominant	0.031	1.163 (1.014~1.335)	
LPL	C1595G (Ser447Stop)	Recessive	0.044	0.480 (0.235~0.979)	
ABCC8	G3857A (Arg1273Arg)	Dominant	0.020	0.821 (0.695~0.969)	
TNF	G-238A	Recessive	0.027	12.037 (1.331~108.862)	
RECQL2	T/C (Cys1367Arg)	Dominant	0.041	0.814 (0.668~0.992)	
THBS2	T/G (3' UTR)	Dominant	0.003	1.295 (1.091~1.537)	
AKAP10	A2073G (Ile646Val)	Dominant	0.005	0.814 (0.706~0.939)	
P2RY12	T744C	Dominant	0.015	1.723 (1.110~2.675)	
AGTR2	C3123A	Dominant	<0.0001	1.373 (1.174~1.605)	
CD36	G30294C	Dominant	0.038	0.839 (0.711~0.991)	20
CPB2	T/C (Ile347Thr)	Recessive	0.028	0.845 (0.728~0.982)	
ADIPOR1	C/G	Recessive	0.014	1.418 (1.075~1.872)	
TNFRSF4	A2210G	Dominant	0.064	0.665 (0.432~1.024)	
APOB	T/C (Val591Ala)	Dominant	0.015	2.301 (1.175~4.506)	
ABCC6	G3826A (Arg1268Gln)	Dominant	0.032	0.851 (0.734~0.986)	

【0066】

上記ステップワイズ変数増加法によるロジスティック回帰分析により、危険率3% ($p < 0.03$) で各疾患と有意に関連した因子をリスク判断のための最終的な因子として採用した。ただし、高トリグリセリド血症におけるAPOC3の1100C T多型(優性モデル: $p = 0.048$)、低HDLコレステロール血症におけるAPOA5の-3A G多型(劣性モデル: $p = 0.040$)、高LDLコレステロール血症におけるFABP2の2445G A多型(優性モデル: $p = 0.031$)、LPLの1595C G多型(劣性モデル: $p = 0.044$)に関しては、 p 値が0.03を超えるものの0.05以下であり、かつ脂質代謝異常との関連が示唆されているため、解析に使用した。また、優性モデル、劣性モデルの両者が $p < 0.03$ で有意に関連した多型に関しては、変異型ホモBB、ヘテロ接合体ABの両者を含む優性モデルを採用した。これらの因子に関しては、強制投入法によるロジスティック回帰分析を行い、リスク判断システムに必要な数値を決定した。このとき、優性モデル、劣性モデルの両者が $p < 0.03$ で有意に関連した多型に関しては、対象者の遺伝子型が変異型ホモBBである場合の疾患発症リスクをより正確に判断するために、変異型ホモBBの(0, 1)情報をダミー変数として投入した。これにより、この多型が優性モデルである対象者の場合、BBの多型を持つか、ABの多型を持つかにより疾患発症の確率にどの程度違いがあるかを確認することが可能となる。結果を表25 - 表28に示す。表中には、左欄より順に、因子(Variable)、多型(Polymorphism)、偏回帰係数()、 p 値(p value)、オッズ比(OR)、95%信頼区間(95% CI)をそれぞれ示している。

【0067】

【表 2 5】

Variable	Polymorphism	β	P value	OR (95%CI)	
Hypercholesterolemia					
Male		-0.627	< 0.0001	0.534 (0.471~0.605)	
APOE	TT+CT	-0.608	< 0.0001	0.544 (0.420~0.705)	
AGT	AA+GA	0.355	< 0.0001	1.426 (1.215~1.675)	
BMI		0.041	< 0.0001	1.042 (1.023~1.062)	
APOE	CC+TC	0.272	0.0004	1.312 (1.128~1.527)	
CETP	TT	0.291	0.0005	1.337 (1.136~1.574)	
APOA5	CC	-0.219	0.001	0.804 (0.708~0.912)	10
ABCC8	AA+GA	-0.217	0.006	0.805 (0.691~0.938)	
LIPC	AA	-0.210	0.006	0.811 (0.699~0.941)	
APOB	CC+TC	0.829	0.007	2.290 (1.256~4.176)	
EPHX2	AA+GA	0.169	0.009	1.184 (1.042~1.345)	
PDE4D	-- +TAAA-	-0.171	0.010	0.842 (0.740~0.959)	
VAMP8	GG	0.227	0.010	1.255 (1.057~1.490)	
LTA	AA	-0.221	0.012	0.802 (0.675~0.952)	
SERPINE1	5G5G+4G5G	-0.148	0.021	0.862 (0.760~0.978)	
ABCA1	AA	-0.168	0.023	0.846 (0.732~0.977)	
ENPP1	CC	-0.941	0.023	0.390 (0.173~0.880)	20
CD14	TT	0.156	0.025	1.168 (1.019~1.339)	
GJA4	TT+CT	0.141	0.034	1.152 (1.011~1.312)	

【 0 0 6 8 】

【表 2 6】

Variable	Polymorphism	β	P value	OR (95%CI)	
Hypertriglyceridemia					
BMI		0.130	< 0.0001	1.138 (1.117~1.160)	
Male		0.383	< 0.0001	1.466 (1.298~1.656)	
LPL	GG+CG	-0.371	< 0.0001	0.690 (0.596~0.799)	30
APOA5	TT+GT	0.331	0.0002	1.392 (1.166~1.661)	
ACAT2	GG	-0.577	0.0005	0.562 (0.407~0.776)	
APOA5	CC+TC	-0.332	0.001	0.717 (0.595~0.865)	
APOE	CC	0.920	0.002	2.509 (1.405~4.479)	
CYP7A1	GG+AG	-0.217	0.002	0.805 (0.702~0.923)	
MMP1	GG+AG	-0.234	0.003	0.792 (0.678~0.924)	
THBD	TT	0.320	0.005	1.377 (1.099~1.726)	
CYP3A5	GG+AG	-0.162	0.009	0.850 (0.753~0.960)	
MTP	TT	-0.527	0.009	0.590 (0.396~0.879)	
PDE4D	TT+CT	-0.181	0.011	0.835 (0.727~0.959)	40
PCSK9	GG	0.334	0.013	1.396 (1.072~1.818)	
SERPINE1	5G5G	0.201	0.019	1.223 (1.033~1.448)	
ITGB2	TT	0.286	0.021	1.332 (1.044~1.699)	
APOC3	TT+CT	0.181	0.050	1.198 (1.000~1.435)	

【 0 0 6 9 】

【表 2 7】

Variable	Polymorphism	β	P value	OR (95%CI)	
Low HDL-cholesterol					
Male		1.275	< 0.0001	3.578 (2.976~4.302)	
BMI		0.093	< 0.0001	1.097 (1.071~1.124)	
AGT	AA+GA	0.532	< 0.0001	1.702 (1.334~2.171)	
LPL	GG+CG	-0.422	< 0.0001	0.656 (0.536~0.802)	
APOA5	TT+GT	0.457	< 0.0001	1.579 (1.267~1.969)	
CETP	TT	-0.331	0.0003	0.718 (0.601~0.858)	10
LIPC	AA+GA	0.352	0.001	1.422 (1.162~1.741)	
APOE	TT	0.281	0.001	1.325 (1.126~1.560)	
APOB	TT+CT	0.337	0.001	1.401 (1.140~1.720)	
TNF	TT	0.625	0.002	1.867 (1.264~2.759)	
APOA5	CC+TC	-0.890	0.002	0.411 (0.232~0.728)	
SERPINE1	5G5G	0.304	0.005	1.355 (1.094~1.678)	
PSMA6	GG+CG	0.218	0.007	1.243 (1.060~1.458)	
ABCB1	GG	-0.302	0.008	0.739 (0.593~0.923)	
UTS2	AA+CA	0.212	0.010	1.236 (1.052~1.451)	
APOE	CC+TC	0.251	0.010	1.286 (1.062~1.556)	
AGTR2	AA	0.222	0.010	1.248 (1.054~1.477)	20
CD14	AA+GA	0.232	0.021	1.261 (1.035~1.536)	
ADIPOQ	TT+GT	0.177	0.027	1.194 (1.020~1.397)	
APOA5	GG	0.622	0.033	1.862 (1.051~3.298)	

【 0 0 7 0】

【表 2 8】

Variable	Polymorphism	β	P value	OR (95%CI)	
High LDL-cholesterol					
APOE	TT+CT	-0.751	< 0.0001	0.472 (0.350~0.635)	30
Male		-0.333	< 0.0001	0.717 (0.626~0.820)	
AGTR2	AA+GA	0.334	< 0.0001	1.396 (1.198~1.627)	
APOE	CC+TC	0.346	< 0.0001	1.413 (1.205~1.658)	
AGT	AA+GA	0.385	0.0002	1.469 (1.200~1.798)	
THBS2	GG+TG	0.250	0.004	1.284 (1.084~1.521)	
ADIPOR1	GG	0.358	0.010	1.431 (1.089~1.880)	
AKAP10	GG+AG	-0.184	0.011	0.832 (0.723~0.958)	
P2RY12	CC+TC	0.499	0.024	1.646 (1.069~2.535)	
CPB2	CC	-0.169	0.025	0.844 (0.728~0.979)	
APOB	CC+TC	0.731	0.026	2.077 (1.091~3.953)	
TNF	AA	2.479	0.027	11.933 (1.325~107.471)	40
ABCC8	AA+GA	-0.184	0.029	0.832 (0.706~0.981)	
LPL	GG	-0.770	0.034	0.463 (0.227~0.942)	
FABP2	AA+GA	0.144	0.037	1.155 (1.009~1.323)	

【 0 0 7 1】

高コレステロール血症の罹患率に対し、統計的有意性が高い順に、性別 (Sex)、APOE の 4070C T 多型 (優性モデル)、AGT の -6G A 多型 (優性モデル)、BMI、APOE の 3932T C 多型 (優性モデル)、CETP の C T 多型 (劣性モデル)、APOA5 の -1131T C 多型 (劣性モデル) が有意であり ($p < 0.001$)、各要因が独立して高コレステロール血症に影響を与えることが分かった。同様に、高

トリグリセリド血症の罹患率に対し、BMI、性別、LPLの1595C G多型(優性モデル)、APOA5の-1131T C多型(優性モデル)、APOA5の553G T多型(優性モデル)、ACAT2の41A G多型(劣性モデル)が、低HDLコレステロール血症の罹患率に対し、性別、BMI、AGTの-6G A多型(優性モデル)、LPLの1595C G多型(優性モデル)、APOA5の553G T多型(優性モデル)、CETPの-629C T多型(劣性モデル)、LIPCの-250G A多型(優性モデル)、APOEの-219G T多型(劣性モデル)が、高LDLコレステロール血症の罹患率に対し、APOEの4070C T多型(優性モデル)、性別、AGTRの3132C A多型(優性モデル)、APOEの3932T C多型(優性モデル)、AGTの-6G A多型(優性モデル)が有意であり(p<0.001)、各要因が独立して疾患に影響を与えることが分かった。

10

【0072】

各因子の偏回帰係数により得られるロジスティック回帰モデルより、対象集団における疾患発症確率のロジットの推定が可能となる。受診者ごとに予測されたロジットの値を低い順に並べた場合、値が大きいほど対象集団における発症リスクは高くなる。したがって、疾患との関連が示された遺伝因子およびその他の因子の検査結果から本モデルにおける順位を解析することで、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、低HDLコレステロール血症、高LDLコレステロール血症の発症リスクを推定することが可能となる。

【0073】

<考察>

20

本発明者は、5,421名の日本人からなる2つの独立した集団において、195個の候補遺伝子中の258個の多型と、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、低HDLコレステロール血症、および高LDLコレステロール血症との関連を調べた。今回の大規模研究によって、(1)ABCA1の1051G A多型、ABCC8の3857G A多型、AGTの-6G A多型、APOA5の-1131T C多型、553G T多型、APOBのT C多型、APOEの4070C T多型、3932T C多型、CD14の-260C T多型、CETPの-629C A多型、ENPP1の97A C多型、EPHX2のG A多型、GJA4の1019C T多型、LIPCの-250G A多型、LTAの804C A多型、PDE4DのTAAA -多型、SERPINE1の6684G 5G多型、VAMP8のA G多型が高コレステロール血症と有意に
 関連すること、(2)ACAT2の41A G多型、APOA5の-1131T C多型、553G T多型、APOC3の1100C T多型、APOEの3932T C多型、CYP3A5の6986A G多型、CYP7A1の-204A C多型、ITGB2の1323C T多型、LPLの1595C G多型、MMP1の-519A G多型、MTPの-493G T多型、PCSK9のA G多型、PDE4DのC T多型、SERPINE1の6684G 5G多型、THBDの2136C T多型が高トリグリセリド血症と有意に関連すること、(3)ABCB1のT G多型、ADIPOQの62G T多型、AGTの-6G A多型、AGTR2の3123C A多型、APOA5の-3A G多型、-1131T C多型、APOBのC T多型、APOEの-219G T多型、3932T C多型、CD14の-260C T多型、CETPの-629C A
 多型、LIPCの-250G A多型、LPLの1595C G多型、PSMA6の-8C G多型、SERPINE1の6684G 5G多型、TNFの-850C T多型、UTS2の347G A多型が、低HDLコレステロール血症と有意に関連すること、
 および(4)ABCC8の3857G A多型、ADIPOR1のC G多型、AGTの-6G A多型、AGTR2の3123C A多型、AKAP10の2073A G多型、APOBのT C多型、APOEの4070C T多型、3932T C多型、CPB2のT C多型、FABP2の2445G A多型、LPLの1595C G多型、P2RY12の744T C多型、THBS2の3949T G多型、TNFの-238G A多型が高LDLコレステロール血症と有意に関連することがわかった。

30

40

【0074】

50

最後に、高コレステロール血症では上記 17 個の多型と性別、BMI、高トリグリセリド血症では上記 15 個の多型と性別、BMI、低 HDL コレステロール血症では上記 18 個の多型と性別、BMI、高 LDL コレステロール血症では上記 14 個の多型と性別の情報をロジスティック回帰式に投入し、これらの遺伝子型の組み合わせによる遺伝的リスクを A - E の 5 段階で評価した。結果を表 29 - 表 32 に示す。表中においては、左より順に、各多型の遺伝子名、遺伝子型、年齢、性別、ロジット、5 段階評価を示す。5 段階評価は、受診者の発症確率のロジットを推定し、その分布からリスクの程度を 5 段階に分ける。コントロール群のリスク値の大きい順に全体を 5%、20%、50%、20%、5% に区分し、リスク値の最も大きい 5% の群をリスクが高い群、次の 20% の群をリスクがやや高い群、次の 50% の群を平均的リスクの群、次の 20% の群をリスクがやや低い群、リスク値が最も小さい 5% の群をリスクが低い群とする。本発明においては、遺伝的リスクを 5 段階評価で提示することにより、発症リスクが容易に推定可能となる。

10

【 0 0 7 5 】

【表 29】

Hypercholesterolemia

Symbol	ABCA1 AA+GA	ABCC8 TT+CT	AGT CC+TC	APOA5 AA	APOB TT+CT	APOE CC	APOE AA
Sample1	1	1	0	0	0	1	0
Sample2	1	1	0	0	1	0	0
Sample3	0	0	1	0	0	0	0
Sample4	1	0	1	0	0	0	0
Sample5	1	0	0	1	0	0	1

20

Symbol	CD14 AA	CETP 5G5G+4G5G	ENPP1 AA+GA	EPHX2 TT	GJA4 CC	LIPC -- +TAAA-	LTA AA+GA
Sample1	0	0	0	0	0	1	0
Sample2	0	1	0	0	1	0	0
Sample3	0	1	0	0	0	0	1
Sample4	0	1	1	0	0	0	0
Sample5	0	1	0	0	0	0	1

30

Symbol	PDE4D GG	SERPINE1 CC+TC	VAMP8 TT	male	BMI	logit	estimate A,B,C,D,E
Sample1	0	0	1	1	24.72	0.0375	A
Sample2	0	1	1	1	23.00	0.1783	B
Sample3	0	1	0	1	23.47	0.2597	C
Sample4	0	1	1	1	24.30	0.3129	D
Sample5	1	1	1	0	31.60	0.4510	E

40

A: logit below 0.125

B: logit 0.125~0.190

C: logit 0.190~0.282

D: logit 0.282~0.325

E: logit over 0.325

【 0 0 7 6 】

【表 3 0】

Hypertriglyceridemia

Symbol	APOC3 TT+CT	APOE CC	ITGB2 TT	LPL GG+CG	SERPINE1 5G5G	THBD TT	MTP TT
Sample6	0	0	0	0	0	0	1
Sample7	1	0	0	0	0	0	0
Sample8	1	0	0	0	0	0	0
Sample9	1	0	0	0	0	0	0
Sample10	1	0	0	0	0	1	0

10

Symbol	APOA5 CC+TC	MMP1 GG+AG	PDE4D TT+CT	APOA5 TT+GT	PCSK9 GG	ACAT2 GG	CYP7A1 GG+AG
Sample6	1	1	0	0	1	1	1
Sample7	1	0	1	0	1	0	1
Sample8	1	1	0	0	1	0	0
Sample9	0	0	1	0	1	0	1
Sample10	0	0	1	1	1	0	1

Symbol	CYP3A5 GG+AG	male	BMI	logit	estimate A,B,C,D,E
Sample6	1	0	18.77	0.1225	A
Sample7	1	0	21.63	0.3474	B
Sample8	0	1	22.50	0.4790	C
Sample9	0	1	20.68	0.6356	D
Sample10	0	0	26.60	0.6951	E

20

- A: logit below 0.276
 B: logit 0.276~0.388
 C: logit 0.388~0.559
 D: logit 0.559~0.676
 E: logit over 0.676

30

【 0 0 7 7 】

【表 3 1】

Low HDL-cholesterol

Symbol	ADIPOQ TT+GT	AGT AA+GA	APOE TT	APOE CC+TC	LIPC AA+GA	LPL GG+CG
Sample11	1	1	0	0	0	0
Sample12	1	1	0	1	0	0
Sample13	1	0	0	1	0	1
Sample14	1	1	1	0	1	0
Sample15	0	1	0	0	1	0

10

Symbol	SERPINE1 5G5G	TNF TT	UTS2 AA+CA	CETP TT	CD14 AA+GA	AGTR2 CC+TC
Sample11	1	0	1	0	0	1
Sample12	1	0	1	1	0	0
Sample13	0	0	0	1	0	0
Sample14	0	0	1	1	0	0
Sample15	0	1	0	1	0	1

20

Symbol	APOA5 CC+TC	PSMA6 GG+CG	APOA5 GG	APOB TT+CT	APOA5 TT+GT	ABCB1 GG
Sample11	1	1	0	0	1	1
Sample12	1	0	1	0	0	0
Sample13	1	0	0	0	0	0
Sample14	0	0	0	0	1	1
Sample15	1	1	0	0	0	0

30

Symbol	male	BMI	logit	estimate A,B,C,D,E
Sample11	0	17.90	0.0276	A
Sample12	0	20.77	0.0452	B
Sample13	1	22.89	0.0807	C
Sample14	1	27.20	0.3026	D
Sample15	1	25.50	0.3797	E

A: logit below 0.029

B: logit 0.029~0.060

C: logit 0.060~0.178

D: logit 0.178~0.256

E: logit over 0.256

40

【 0 0 7 8 】

【表 3 2】

High LDL-cholesterol

Symbol	AGT AA+GA	APOE TT+CT	APOE CC+TC	FABP2 AA+GA	LPL GG	ABCC8 AA+GA	TNF AA
Sample11	0	1	0	0	1	0	0
Sample12	1	0	0	0	0	0	0
Sample13	1	0	0	1	0	0	0
Sample14	1	0	0	1	0	0	0
Sample15	1	0	0	0	0	0	0

10

Symbol	THBS2 GG+TG	AKAP10 GG+AG	P2RY12 CC+TC	AGTR2 AA+GA	CPB2 CC	ADIPOR1 GG	APOB CC+TC
Sample11	0	1	1	0	1	0	1
Sample12	0	0	1	0	1	0	1
Sample13	1	0	1	0	1	0	1
Sample14	0	0	1	1	1	0	1
Sample15	1	0	1	1	0	0	1

Symbol	male	logit	estimate A,B,C,D,E
Sample11	0	0.0349	A
Sample12	1	0.1249	B
Sample13	1	0.1747	C
Sample14	0	0.2431	D
Sample15	0	0.2971	E

20

- A: logit below 0.084
 B: logit 0.084~0.140
 C: logit 0.140~0.216
 D: logit 0.216~0.292
 E: logit over 0.292

30

【 0 0 7 9 】

APOA5、APOA1、およびAPOC3について

染色体11q23上のアポリポロタン遺伝子クラスター(APOA5 - APOA1 - APOC3 - APOA4)は、血中脂質濃度と定量的に相関する遺伝子領域である。APOA5は、良く知られているAPOA1 - APOC3 - APOA4遺伝子クラスター(非特許文献9)の約27kb上流に位置しており、血中トリグリセリド濃度と強く相関することが知られている(非特許文献10)。ヒトAPOA5は、4個のエクソンによって構成されており、369個のアミノ酸からなるタンパク質である(非特許文献10)。マウスを用いた実験によれば、APOA5の発現量は、血中トリグリセリド濃度に大きな影響を与えることが知られている。ヒトAPOA5を発現するトランスジェニックマウスの血中トリグリセリド濃度は、コントロール動物の血中トリグリセリド濃度の1/3であるのに対し、APOA5をノックアウトしたマウスでは、血中トリグリセリド濃度はコントロールの4倍であった(非特許文献10)。

40

【 0 0 8 0 】

ヒトAPOA5のプロモータ領域にある-1131T C多型は、多くの民族において、血中トリグリセリド濃度と独立して相関しており、このとき変異型のCアレルは、トリグリセリド濃度を上昇させる危険因子である(非特許文献7、10-14)。この多型は

50

、アジア人および白人において、トリグリセリド濃度およびHDLコレステロール濃度とも関連しており、Cアレルを持つとHDLコレステロール濃度が減少することが知られている（非特許文献7、12-14）。APOA5の-3A G多型（非特許文献7、15）と553G T（Gly185Cys）多型（非特許文献16）は、-1131T C多型と連鎖不平衡の関係にあり、トリグリセリド濃度の変化と関係している。これらの知見によれば、APOA5は、ヒトにおいて、トリグリセリドおよびHDLコレステロールの調節に重要な役割を果たしていることがわかる。我々の研究によれば、APOA5の-1131T C多型、-3A G多型、および553G T（Gly185Cys）多型が高トリグリセリド血症と低HDLコレステロール血症に関連しており、このとき変異型のC、G、およびTアレルは、リスク因子であることが示された。これらのデータは、従来の知見と矛盾するものではない（非特許文献7、12-16）。

10

【0081】

トリグリセリド代謝において、アポリポプロテインA-Vが果たす役割については、未だにわかっていない。アポリポプロテインA-Vは、疎水的表面では、高活性、低弾性、および遅結合活性を示し（非特許文献17）、トリグリセリドが多い粒子の集合を妨害する活性を示す。APOA5トランスジェニックマウスでは、VLDL-トリグリセリド濃度が顕著に減少するという知見（非特許文献10）に加え、インビトロ実験の結果では、組換えアポリポプロテインA-Vがリポプロテインリパーゼの活性に参与し、これを増加することが知られている（非特許文献18）。アポリポプロテインA-Vは、肝VLDL合成を減少させ、VLDL除去を増加することにより、VLDL-トリグリセリド濃度を減少させるのかも知れない。

20

【0082】

79個のアミノ酸から構成される糖タンパクのアポリポプロテインC-IIIは、肝臓と小腸で合成され、トリグリセリドに富むリポプロテインとHDLの主要な要素である。このタンパク質は、血中トリグリセリド濃度の調節に重要である（非特許文献19）。すなわち、リポプロテインリパーゼの阻害、肝トリグリセリドリパーゼ活性の阻害、および細胞膜のグリコサミノグリカンとリポプロテインの結合を阻害することにより、VLDLの脂質分解を阻害する（非特許文献20）。APOC3中の多型、またはAPOC3の近傍のいくつかの多型が、高トリグリセリド血症と関連している。APOC3の3'非翻訳領域の多様型SstI部位（3238C G）は、様々な民族において高トリグリセリド血症に関連していることが知られている（非特許文献6、9）。APOC3の1100C T多型は、血中トリグリセリド濃度と関連していることが知られている（非特許文献21）。今回の研究では、APOC3の1100C T多型が高トリグリセリド血症に関連し、Tアレルが危険因子であることがわかった。

30

【0083】

アポリポプロテインA-Iは、肝臓と、小腸で合成され、HDLの主要構成要素である（非特許文献9）。このタンパク質は、細胞のコレステロールの恒常性に重要な役割を果たしている。また、このタンパク質は、酵素レシチン（コレステロールアシルトランスフェラーゼ）の共同因子であり、末梢組織から肝臓にコレステロールを運搬する際に主要な役割を果たす（非特許文献9）。この経路は、アテローム性動脈硬化に対向するものであると考えられている。実際に、ヒトAPOA1を発現するトランスジェニックマウスでは、食餌由来のアテローム性動脈硬化の発達を阻害することが知られている（非特許文献22）。APOA1の84T C多型は、血中トリグリセリドおよびHDLコレステロール濃度に関連することが知られている（非特許文献23）。今回の研究では、APOA1の84T C多型が、高トリグリセリド血症に関連し、Cアレルが保護因子であることが明らかとなった。

40

【0084】

LPL

リポプロテインリパーゼ（LPL）は、血中のトリグリセリドに富むリポタンパク質の脂質分解を行う律速酵素である。このタンパク質は、脂肪組織の実質細胞、骨格筋、およ

50

び心筋で合成され、血管内皮のヘパラン硫酸結合部位に運ばれる（非特許文献24）。LPLの加水分解機能は、トリグリセリドに富むカイロミクロンやVLDLをレムナント粒子にするための処理、およびリン脂質とアポリポプロテインをHDLに運搬するために重要である。また、LPLは、血中のリポプロテインを受容体を介して除去するために重要な働きを果たしている（非特許文献25）。LPLは多様型であり、アミノ酸の置換によって、トリグリセリドおよびHDLコレステロール濃度に影響を与える。これらの濃度は、アテローム性動脈硬化の発生について影響を与えている（非特許文献26）。

【0085】

LPLの1595C G (Ser447Stop)多型は、LPLのC末端の2個のアミノ酸を除去する。この変化は、このタンパク質と受容体との結合活性を上昇または促進させるか、ダイマーの形成に影響を与えると考えられている（非特許文献26）。1595C G (Ser447Stop)多型のGアレルは、血中トリグリセリド濃度を減少させるか、HDLコレステロール濃度を上昇させる（或いは、両方の作用）と言われている（非特許文献5、25、26）。過去の知見によれば、2個のアミノ酸が除去されたLPL変異体の酵素活性と安定性とは、ほとんど野生型と同じであるが、血中のLPL濃度が上昇することにより、LPL活性が増加するようである（非特許文献25、27）。今回の研究では、LPLの1595C G (Ser447Stop)多型が高トリグリセリド血症に関連しており、このときG (Stop)アレルが保護因子であることがわかった。この知見は、従来知見と矛盾しない（非特許文献5、25、26）。

10

【0086】

APOE

アポリポプロテインEは、脂質運搬と脂質代謝に重要な役割を果たしている。APOEの3つの一般的なアレル（2、3、4）は、三つの主要なアイソフォーム（E2、E3、E4）をコードしている。これらのアイソフォームは、112位と158位のアミノ酸が異なっている。4ではLDLコレステロール濃度が高く、2では低いというデータに基づき、APOEのアレル変異によって、総コレステロール濃度およびLDLコレステロール濃度の個体差が説明される（非特許文献28-30）。各種のアポリポプロテインEアイソフォームは、特異的なリポプロテイン受容体と異なった相互作用を示し、最終的に血中コレステロール濃度に影響を与える（非特許文献31）。

20

【0087】

VLDL、カイロミクロン、およびカイロミクロンレムナントのアポリポプロテインEは、肝臓において、特異的な受容体と結合する。2アレルを持つ者は、ApoE2アイソフォームの結合特性の結果として、VLDLとカイロミクロンの合成能力、およびそれらを血中から肝臓に運搬する能力に劣る。これに対し、3と4アレルを持つ者では、これらの処理能力は優れている。このため、3と4アレルを持つ者と比べると、2アレルを持つ者では、血中から食事に含まれる脂質を代謝するまでの時間が遅い（非特許文献32）。食後のリポプロテイン粒子の取り込みの相違は、肝LDL受容体の制御の相違に基づくが、これは、血中全コレステロール濃度およびLDLコレステロール濃度が、遺伝子型の相違によるものであることに依る（非特許文献33-35）。

30

今回の研究においては、我々は、APOEの4070C T (Arg158Cys)と3932T C (Cys112Arg)が高LDLコレステロール血症に関連し、4070TアレルとE2アイソフォームをコードするハプロタイプが保護因子であること、および3932CアレルとE4アイソフォームをコードするハプロタイプがリスク因子であることを明らかとした。この結果は、従来知見と矛盾しない（非特許文献8、28-30、33-35）。

40

【0088】

脂肪酸結合タンパク質2 (FABP2)は、小腸の円柱状の吸収上皮細胞においてのみ発現される細胞内タンパク質である。このタンパク質は、飽和および不飽和脂肪酸に対して高い親和性を持つ単一の結合部位を持っており、長鎖脂肪酸の吸収および細胞内輸送に寄与している。FABP2の2445G A (Ala54Thr)多型においてA対立遺

50

伝子産物は、G対立遺伝子産物に比べると、インビトロ試験系で長鎖脂肪酸に対して大きな親和性を示した(非特許文献44)。また、A対立遺伝子は、血漿中LDLコレステロール濃度がより高く(非特許文献17)、メタボリック症候群と脂質代謝異常に関連することが認められている(非特許文献45)。

< 結論 >

我々の研究によれば、日本人においては、APOA5、APOC3、APOA1、およびLPLは高トリグリセリド血症に関連し、APOA5とAPOEは低HDLコレステロール血症と高LDLコレステロール血症に、FABP2は高LDLコレステロール血症に関連していた。この結果に基づき、遺伝子多型を調べることにより、脂質代謝異常の危険性を知ることができる。

このように本実施形態によれば、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、低HDLコレステロール血症、高LDLコレステロール血症を含む脂質代謝異常について、遺伝的リスクを判断するための検出法を提供することができる。この実施形態を用いることにより、脂質代謝異常の予防が可能となり、高齢者の健康寿命延長・QOL向上・ねたきり防止ならびに今後の医療費削減など、医学的・社会的に大きく貢献できる。

【0089】

【非特許文献1】J.M. Ordovas, Nutrigenetics, plasma lipids, and cardiovascular risk, J. Am. Diet. Assoc. 106 (2006) 1074-1081.

【非特許文献2】B.T. Heijmans et al., Meta-analysis of four new genome scans for lipid parameters and analysis of positional candidates in positive linkage regions, Eur. J. Hum. Genet. 13 (2005) 1143-1153.

【非特許文献3】A. Malhotra et al., Meta-analysis of genome-wide linkage studies for quantitative lipid traits in African Americans, Hum. Mol. Genet. 14 (2005) 3955-3962.

【非特許文献4】S.J. Bielinski et al., Genome-wide linkage scans for loci affecting total cholesterol, HDL-C, and triglycerides: the Family Blood Pressure Program, Hum. Genet. 120 (2006) 371-380.

【非特許文献5】R. Jemaa et al., Lipoprotein lipase gene polymorphisms: associations with myocardial infarction and lipoprotein levels, the ECTIM study, J. Lipid Res. 36 (1995) 2141-2146.

【非特許文献6】A.P. Surguchov, G.P. Page, L. Smith, W. Patsch, E. Boerwinkle, Polymorphic markers in apolipoprotein C-III gene flanking regions and hypertriglyceridemia, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16 (1996) 941-947.

【非特許文献7】C.Q. Lai et al., The APOA5 locus is a strong determinant of plasma triglyceride concentrations across ethnic groups in Singapore, J. Lipid Res. 44 (2003) 2365-2373.

【非特許文献8】K.A. Volcik et al., Apolipoprotein E polymorphisms predict low density lipoprotein cholesterol levels and carotid artery wall thickness but not incident coronary heart disease in 12,491 ARIC study participants, Am. J. Epidemiol. 164 (2006) 342-348.

【非特許文献9】M. Groenendijk, R.M. Cantor, T.W. de Bruin, G.M. Dallinga-Thie, The apoA1-CIII-AIV gene cluster, Atherosclerosis 157 (2001) 1-11.

【非特許文献10】L.A. Pennacchio et al., An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing, Science 294 (2001) 169-173.

【非特許文献11】T. Nabika, S. Nasreen, S. Kobayashi, J. Masuda, The genetic effect of the apoprotein AV gene on the serum triglyceride level in Japanese, Atherosclerosis 165 (2002) 201-204.

【非特許文献12】K. Endo et al., Association found between the promoter region polymorphism in the apolipoprotein A-V gene and the serum triglyceride level in

10

20

30

40

50

Japanese schoolchildren, *Hum. Genet.* 111 (2002) 570-572.

【非特許文献 1 3】B.E. Aouizerat et al., Genetic analysis of a polymorphism in the human apoA-V gene: effect on plasma lipids, *J. Lipid Res.* 44 (2003) 1167-1173

【非特許文献 1 4】G.P. Li et al., Genetic effect of two polymorphisms in the apo lipoprotein A5 gene and apolipoprotein C3 gene on serum lipids and lipoproteins levels in a Chinese population, *Clin. Genet.* 65 (2004) 470-476.

【非特許文献 1 5】K.L. Klos et al., APOA5 polymorphisms influence plasma triglycerides in young, healthy African Americans and whites of the CARDIA Study, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 564-571.

【非特許文献 1 6】J.T. Kao, H.C. Wen, K.L. Chien, H.C. Hsu, S.W. Lin, A novel genetic variant in the apolipoprotein A5 gene is associated with hypertriglyceridemia, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 2533-2539.

【非特許文献 1 7】R.B. Weinberg et al., Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 34438-34444.

【非特許文献 1 8】J. Fruchart-Najib et al., Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319 (2004) 397-404.

【非特許文献 1 9】Y. Ito, N. Azrolan, A. O'Connell, A. Walsh, J.L. Breslow, Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice, *Science* 249 (1990) 790-793.

【非特許文献 2 0】N.S. Shachter, Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism, *Curr. Opin. Lipidol.* 12 (2001) 297-304.

【非特許文献 2 1】D.W. Waterworth et al., Contribution of apolipoprotein C-III gene variants to determination of triglyceride levels and interaction with smoking in middle-aged men, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2000) 2663-2669.

【非特許文献 2 2】E.M. Rubin, R.M. Krauss, E.A. Spangler, J.G. Verstuyft, S.M. Clift, Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI, *Nature* 353 (1991) 265-267.

【非特許文献 2 3】K. Shioji et al., An association analysis between ApoA1 polymorphisms and the high-density lipoprotein (HDL) cholesterol level and myocardial infarction (MI) in Japanese, *J. Hum. Genet.* 49 (2004) 433-439.

【非特許文献 2 4】J.J.P. Kastelein et al., Lipoprotein lipase activity is associated with severity of angina pectoris, *Circulation* 102 (2000) 1629-1633.

【非特許文献 2 5】B.E. Groenemeijer et al., Genetic variant showing a positive interaction with β -blocking agents with a beneficial influence on lipoprotein lipase activity, HDL cholesterol, and triglyceride levels in coronary artery disease patients. The Ser447-stop substitution in the lipoprotein lipase gene, *Circulation* 95 (1997) 2628-2635.

【非特許文献 2 6】H.H. Wittrup, A. Tybjarg-Hansen, B.G. Nordestgaard, Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A meta-analysis, *Circulation* 99 (1999) 2901-2907.

【非特許文献 2 7】H. Zhang et al., Common sequence variants of lipoprotein lipase: standardized studies of in vitro expression and catalytic function, *Biochim. Biophys. Acta* 1302 (1996) 159-166.

【非特許文献 2 8】C.F. Sing, J. Davignon, Role of apolipoprotein E genetic polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation, *Am. J. Hum. Genet.* 37 (1985) 268-285.

【非特許文献 2 9】C. Ehnholm, M. Lukka, T. Kuusi, E. Nikkila, G. Utermann, Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population: gene frequencies and ratio

10

20

30

40

50

n to lipoprotein concentrations, *J. Lipid Res.* 27 (1986) 227-235.

【非特許文献 3 0】M. Xhignesse, S. Lussier-Cacan, C.F. Sing, A.M. Kessling, J. Davignon, Influences of common variants of apolipoprotein E on measures of lipid metabolism in a sample selected for health, *Arterioscler. Thromb.* 11 (1991) 1100-1110.

【非特許文献 3 1】J.E. Eichner et al., Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review, *Am. J. Epidemiol.* 155 (2002) 487-495.

【非特許文献 3 2】M.S. Weintraub, S. Eisenberg, J.L. Breslow, Dietary fat clearance in normal subjects is regulated by genetic variation in apolipoprotein E, *J. Clin. Invest.* 80 (1987) 1571-1577.

【非特許文献 3 3】J. Davignon, R.E. Gregg, C.F. Sing, Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis, *Arteriosclerosis* 8 (1988) 1-21.

【非特許文献 3 4】D.M. Hallman et al., The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations, *Am. J. Hum. Genet.* 49 (1991) 338-349.

【非特許文献 3 5】E.J. Schaefer et al., Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein levels: results from the Framingham Offspring Study, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 14 (1994) 1105-1113.

【非特許文献 3 6】W. Richmond, Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum, *Clin. Chem.* 19 (1973) 1350-1356.

【非特許文献 3 7】K. Tamaoku, K. Ueno, K. Akiura, Y. Ohkura, New water-soluble hydrogen donors for the enzymatic photometric determination of hydrogen peroxide. II. N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)aniline derivatives, *Chem. Pharm. Bull.* 30 (1982) 2492-2497.

【非特許文献 3 8】T.J. Bronzert, H.B. Brewer Jr., New micromethod for measuring cholesterol in plasma lipoprotein fractions, *Clin. Chem.* 23 (1977) 2089-2098.

【非特許文献 3 9】M. Okada, H. Matsui, Y. Ito, A. Fujiwara, K. Inano, Low density lipoprotein cholesterol can be chemically measured: a new superior method, *J. Lab. Clin. Med.* 132 (1998) 195-201.

【非特許文献 4 0】G.R. Warnick, R.H. Knopp, V. Fitzpatrick, L. Branson, Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints, *Clin. Chem.* 36 (1990) 15-19.

【非特許文献 4 1】A.J. Tremblay et al., Validation of the Friedewald formula for the determination of low-density lipoprotein cholesterol compared with β -quantification in a large population, *Clin. Biochem.* 37 (2004) 785-790.

【非特許文献 4 2】Y. Itoh et al., High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population, *Immunogenetics* 57 (2005) 717-729.

【非特許文献 4 3】Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing, *J. Royal Stat. Soc. Ser. B* 57 (1995) 289-300.

【非特許文献 4 4】Galluzzi JR, Cupples LA, Otvos JD, Wilson PW, Schaefer EJ, Ordovas JM. Association of the A/T54 polymorphism in the intestinal fatty acid binding protein with variations in plasma lipids in the Framingham Offspring Study. *Atherosclerosis.* 2001;159:417-424.

【非特許文献 4 5】Guettier JM, Georgopoulos A, Tsai MY, Radha V, Shanthirani S, Deepa R, Gross M, Rao G, Mohan V. Polymorphisms in the fatty acid-binding protei

10

20

30

40

50

n 2 and apolipoprotein C-III genes are associated with the metabolic syndrome and dyslipidemia in a South Indian population. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90:1705-1711.

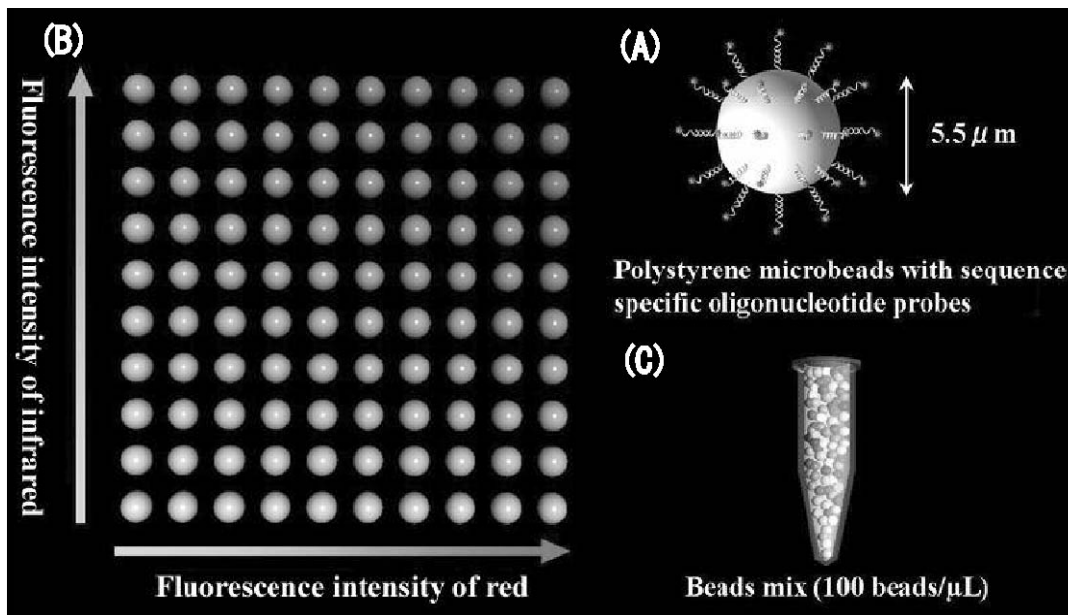
【図面の簡単な説明】

【0090】

【図1】Luminex 100で検出するマイクロビーズの微細構造と特徴を示す図である。

【図2】PCR-SSOP-Luminex法の手順の概要を示す図である。

【図1】



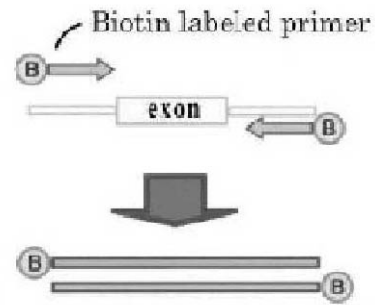
【 図 2 】

< Amplification >



Genome DNA
Master mix
Taq DNA polymerase

Reaction condition
94°C, 20sec.
↓
60°C, 30sec.
↓
72°C, 30sec., 50cyc.

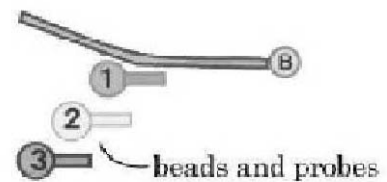


< Hybridization >



Amplified DNA
Bead mixture
Hybridization Buffer

Reaction condition
95°C, 2min.
↓
52°C, 30min.

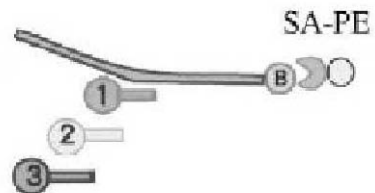


< SA-PE (Streptavidin-phycoerythrin) Reaction >



SA-PE
Phosphate buffer

Reaction condition
52°C, 15min.



< Measurement >



Measurement per 1 sample
about 30 sec.

BeadNumber	BeadID	PE	PCR product
1	○	○	○
2	○	×	×
3	○	×	×

○ means detected.
× means undetected.

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成21年4月20日 (2009.4.20)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

フロントページの続き

(72)発明者 内田 英史

福島県福島市松川町美郷4 - 1 - 1 G & Gサイエンス株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA01 CA09 HA12

4B063 QA17 QA19 QQ42 QQ58 QR08 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34