

令和元年6月3日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19394

研究課題名（和文）網羅的遺伝子解析による新規LDLコレステロール代謝関連分子Xの発見とその機能解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis for molecule X via comprehensive genetic analysis

研究代表者

多田 隼人 (Tada, Hayato)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：90623653

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：現時点では劣性遺伝性疾患の原因分子とされる有害遺伝子変異（ABCG5遺伝子、ABCG8遺伝子、アポE遺伝子、LDLRAP1遺伝子）の集積を確認し（約10%の症例）、これらの遺伝子変異の存在により、LDLコレステロール値上昇や冠動脈疾患のリスクが高まることを示すことができた。現在家族性高コレステロール血症の原因遺伝子とされる、LDL受容体遺伝子、アポB遺伝子、PCSK9遺伝子に加えて、ABCG5遺伝子、ABCG8遺伝子、アポE遺伝子、LDLRAP1遺伝子の有害変異の存在を調査することにより、さらなる冠動脈疾患高リスク患者の抽出が可能であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における高LDLコレステロール血症において、これまでの知見と比較し多彩な遺伝子異常が寄与することを見出した。従って、このような背景を検討するにあたっては、網羅的なスクリーニングシステムを使用する必要がある。

研究成果の概要（英文）：We found that rare as well as deleterious mutations in genes known as causative genes for recessive lipid disorders were associated with increased LDL cholesterol level among Japanese patients with hyper LDL cholesterolemia.

研究分野：循環器遺伝学

キーワード：家族性高コレステロール血症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

日本人死因の第2位と第4位は心疾患と脳血管疾患であり、その合計は第1位の悪性新生物に匹敵する。粥状動脈硬化症は心筋梗塞や脳梗塞などの基礎病態であり、人口の高齢化に伴い今後も増加の一途と考えられ、人類が克服すべき疾患の一つである。粥状動脈硬化は脂質異常症、糖尿病、高血圧や喫煙など古典的危険因子の集積により発症することが知られているが、中でもコレステロールは病変に直接蓄積しており、単なる危険因子のひとつではなく原因物質と考えられる。したがって、コレステロール代謝への介入が粥状動脈硬化の克服に合目的であるが、HMG-CoA還元酵素阻害剤(スタチン)が唯一その成功例であり、更なる脂質代謝改善薬の開発が待たれる。脂質代謝改善薬の多くは臨床像が極端な、遺伝性脂質異常症のメカニズム解明を端緒として開発されてきた。申請者らの研究室は、高LDLコレステロール血症や早発性冠動脈硬化症を特徴とする家族性高コレステロール血症(FH)について、これまで2,000例を超える症例数を経験し、その遺伝学的背景や臨床像を報告するとともに(Noguchi T, Tada H, et al. Atherosclerosis. 2010, Mabuchi H, Tada H, et al. Atherosclerosis. 2014)先行研究により新たな視座からの脂質代謝改善薬のターゲット分子となりうる、本症の新規原因分子の網羅的探索を遂行してきた(平成26年度・科研費・研究活動スタート支援・研究代表者:多田隼人「家族性高コレステロール血症の新規原因遺伝子の網羅的解析」)。この中で、申請者らは、劣性遺伝性形式を呈する著明な高LDLコレステロール血症症例(314mg/dL)を経験し、本例及び両親・同胞の合計4名を対象に全エクソームシーケンシング解析を行い、既知のLDL関連遺伝子座には有意な変異が認められないこと、さらには、遺伝形式や変異の効果予測などから、責任分子と思われる新規候補「分子X」遺伝子異常を見出した。全エクソーム領域に、「分子X」以外に合理的な変異は認められず、「分子X」が発端者の高LDLコレステロール血症と関係していることが強く示唆される。また、「分子X」は国際的競争・特許取得の観点から分子名は明らかに出来ないが、興味深いことにシトクロムP450関連分子の一種で、基礎実験で脂質代謝に関与する可能性が示唆されているが、これまで疾患との関連は報告されていない。一方、申請者らは本家系とは別に、既知のLDL関連遺伝子座に責任変異を有さない著明な高LDLコレステロール血症を呈する劣性遺伝形式を呈する家系を複数有しており、これらの中に今回同定された新規候補「分子X」の遺伝子異常を持つものが存在する可能性がある。

#### 2. 研究の目的

発端者と血縁者の臨床像が極端かつ明確な場合、全エクソームシーケンシング法が原因遺伝子の特定に絶大な効果を発揮し、特に劣性遺伝性疾患の場合は直接的に原因遺伝子の特定に至る可能性が高い。そこで、本研究は「分子X」につき、3つの異なるアプローチにより、① LDL代謝に果たす影響を検討し、高LDLコレステロール血症における意義を遺伝疫学的に明確にし、② 遺伝子改変マウスを樹立し、「分子X」の生理的役割及びその動脈硬化惹起性の検討を行うと共に、③ 安定同位体を用いた代謝実験により「分子X」のコレステロールに対する影響を明確にすることを目的とした。

#### 3. 研究の方法

LDL代謝に関わるとと思われる新規「分子X」の機能解析を行うとともに、同様の高LDLコレステロール血症を呈するコーホートに対してスクリーニングを行い「分子X」の寄与を明確にする。本研究ではこれらの目標達成のため、① 分子疫学的アプローチ(発端者家系及び高LDLコレステロール血症コーホートに対する「分子X」遺伝子解析)、② 動物モデルによるアプローチ(「分子X」遺伝子改変マウスによる実験)、③ ヒトを対象とした機能解析(発端者及びその血縁者に対する安定同位体(2H3-ロイシン)を用いた代謝実験)の3つの異なるアプローチにより研究を遂行することにより、「分子X」の脂質代謝への寄与を明らかとする予定であった。しかし、下記に詳述の通り、分子疫学的アプローチでの検索では分子Xと高LDLコレステロール血症との有意な関連を見出すことはできなかった。そのため、その他劣性遺伝子疾患起因遺伝子有害変異の寄与の検討を行った。

#### 4. 研究成果

新規の高LDLコレステロール血症を呈する家系(計500例)に対して我々グループで独自に樹立した網羅的遺伝子解析(パネル解析)を行い、シトクロムP450関連分子の一種である新規責任候補「分子X」の希少有害遺伝子変異を検索した。その結果、残念ながら高LDLコレステロール血症を説明しうる、分子Xの有害遺伝子変異は確認することができず、分子XとLDLコレステロールとの明確な関連を証明するには至らなかった。しかし、一方で、これらの解析の経過において、現時点では劣性遺伝性疾患の原因分子とされる有害遺伝子変異(ABCG5遺伝子、ABCG8遺伝子、アポE遺伝子、LDLRAP1遺伝子)の集積を確認し(約10%の症例)これらの遺伝子変異の存在により、LDLコレステロール値上昇や冠動脈疾患のリスクが高まることを示すことができた。従って高LDLコレステロール血症を呈する場合には、家族性高コレステロール血症を念頭に、アキレス腱肥厚や家族歴などの臨床診断基準に照らし精査するとともに、現在家族性高コレステロール血症の原因遺伝子とされる、LDL受容体遺伝子、アポB遺伝子、PCSK9遺伝子に加えて、ABCG5遺伝子、ABCG8遺伝子、アポE遺伝子、LDLRAP1遺伝子の有害変異の存在を調査することにより、さらなる冠動脈疾患高リスク患者の抽出が可能であることを見出した。これらの成果については特許の出願に至った(特願2018-23561)。さらに独立した集団に対してABCG5・ABCG8遺伝子に絞った解析を行ったが同様の傾向であり、これらの希少有害変異の高LDLコレステロール血症への寄与を明確とした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

1. Tada H, Nomura A, Nohara A, Inazu A, Mabuchi H, Yamagishi M, Kawashiri MA. Post-prandial Remnant Lipoprotein Metabolism in Sitosterolemia. *J Atheroscler Thromb*. 2018 Dec 1;25(12):1188-1195. 査読有り doi: 10.5551/jat.44768
2. Nomura A, Tada H, Okada H, Nohara A, Ishikawa H, Yoshimura K, Kawashiri MA. Impact of genetic testing on low-density lipoprotein cholesterol in patients with familial hypercholesterolemia (GenTLe-FH): a randomised waiting list controlled open-label study protocol. *BMJ Open*. 2018 Dec 28;8(12):e023636. 査読有り doi: 10.1136/bmjopen-2018-023636
3. Tada H, Kawashiri MA, Nomura A, Teramoto R, Hosomichi K, Nohara A, Inazu A, Mabuchi H, Tajima A, Yamagishi M. Oligogenic familial hypercholesterolemia, LDL cholesterol, and coronary artery disease. *J Clin Lipidol*. 2018 Nov - Dec;12(6):1436-1444. 査読有り doi: 10.1016/j.jacl.2018.08.006
4. Tada H, Nomura A, Yamagishi M, Kawashiri MA. First case of sitosterolemia caused by double heterozygous mutations in ABCG5 and ABCG8 genes. *J Clin Lipidol*. 2018 Sep - Oct;12(5):1164-1168. 査読有り doi: 10.1016/j.jacl.2018.06.003
5. Okada H, Tada H, Hayashi K, Kawashiri MA, Takata T, Sakata K, Nohara A, Mabuchi H, Yamagishi M, Kawashiri MA. Aortic Root Calcification Score as an Independent Factor for Predicting Major Adverse Cardiac Events in Familial Hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb*. 2018 Jul 1;25(7):634-642. 査読有り doi: 10.5551/jat.42705
6. Tada H, Kawashiri MA, Nohara A, Sakata K, Inazu A, Mabuchi H, Yamagishi M, Hayashi K. Remnant-like particles and coronary artery disease in familial hypercholesterolemia. *Clin Chim Acta*. 2018 Jul;482:120-123. 査読有り doi: 10.1016/j.cca.2018.04.007
7. Tada H, Kawashiri MA, Nohara A, Inazu A, Mabuchi H, Yamagishi M. Assessment of arterial stiffness in patients with familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol*. 2018 Mar - Apr;12(2):397-402. 査読有り doi: 10.1016/j.jacl.2017.12.002
8. Tada H, Kawashiri MA, Nohara A, Inazu A, Mabuchi H, Yamagishi M. Impact of clinical signs and genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia on the prevalence of coronary artery disease in patients with severe hypercholesterolaemia. *Eur Heart J*. 2017 May 21;38(20):1573-1579. 査読有り doi: 10.1093/eurheartj/ehx004

〔学会発表〕(計4件)

1. Tada H. Impact of ABCG5/8 genetic variants on coronary heart disease. 第83回日本循環器学会学術集会 March 29-31, 2019 (横浜)
2. Tada H. Beneficial effect of ezetimibe-atorvastatin combination therapy in patients with a mutation in ABCG5 or ABCG8 gene. The 91st American Heart Association 2018 Scientific Sessions Nov.10-12, 2018 (Chicago)
3. Tada H. Oligogenic Familial Hypercholesterolemia, LDL Cholesterol, and Coronary Artery Disease. 第82回日本循環器学会学術集会 March 23-25, 2018 (大阪)
4. Tada H. Impact of clinical signs and genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia on the prevalence of coronary artery disease in patients with severe hypercholesterolaemia. 第81回日本循環器学会学術集会 March 17-19, 2017 (金沢)

〔図書〕(計1件)

1. 多田隼人, 川尻剛照, 山岸正和 高LDL-Cのプレジジョンメディスン The Lipid Vol. 29 No. 2 22-28, 2018

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：冠動脈疾患の罹患リスクの判定方法又は判定の補助方法

発明者：多田隼人

権利者：多田隼人

種類：特許

番号：特願2018-23561

出願年：2018

国内外の別：国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等：特になし

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者  
なし