

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08681

研究課題名(和文) PCSK9 の遺伝子変異及び分子型が生活習慣病に及ぼす影響とその制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the effect of variants in the PCSK9 gene and molecular type on lifestyle-related diseases and its regulatory mechanism

研究代表者

堀 美香 (Hori, Mika)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：60598043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000 円

研究成果の概要(和文)：PCSK9遺伝子E32Kバリエントは家族性高コレステロール血症(FH)の原因となりうるが、V4IバリエントはFHの病態に寄与しないことを明らかにした。培養細胞を用いた解析で、PCSK9遺伝子V4I・E32Kバリエントは野生型に比較し、PCSK9細胞内発現・分泌量ならびにLDLRの細胞内・膜の発現量やLDLの取り込みについて差は認められなかった。LDLR・PCSK9遺伝子バリエントを有する患者群ではバリエントを認めない患者群に比較して糖尿病罹患率の低下が認められた。FH患者ではLDLR遺伝子バリエントにPCSK9遺伝子V4I/E32Kバリエントが重なると予後不良であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦のFH遺伝子解析ではPCSK9遺伝子V4I・E32Kバリエントが高頻度に検出される。これらのバリエントの意義付けはFH遺伝子解析結果の解釈に役立つ。また、PCSK9遺伝子V4I/E32KバリエントにLDLR遺伝子バリエントの重なるFH患者は予後不良であることから、FH遺伝子解析により冠動脈疾患高リスク患者を早期に発見し、早期診断・早期の治療開始が重要である。

研究成果の概要(英文)：The variants in the PCSK9 gene detected in Japan were annotated in familial hypercholesterolemia (FH) according to ACMG guideline. The E32K variant in the PCSK9 gene can cause FH, but the V4I variant alone does not contribute to the pathophysiology of FH. The V4I・E32K variants in the PCSK9 gene showed no difference in the levels of intracellular expression and secretion of PCSK9, intracellular and membrane expression of LDLR and LDL uptake compared to wild type of PCSK9 using cultured cells. In addition, the prevalence of diabetes mellitus was lower in patients with variants in the LDLR and PCSK9 genes than in patients without variants in the LDLR and PCSK9 genes. Patients with FH with variants in the LDLR gene and V4I/E32K variant in the PCSK9 gene had poor prognosis compared to patients with a variant in the LDLR or PCSK9 gene.

研究分野：脂質代謝、動脈硬化、分子生物学

キーワード：家族性高コレステロール血症 冠動脈疾患 糖尿病 PCSK9 LDLR バリエント 遺伝子解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

家族性高コレステロール血症（FH）は生下時からの高 LDL コレステロール（LDL-C）血症、腱黄色腫、若年性冠動脈疾患を特徴とする常染色体優性遺伝性疾患である。FH の原因遺伝子として、本邦では LDL 受容体（*LDLR*）遺伝子、LDLR を分解する *PCSK9* 遺伝子が報告されている。*PCSK9* 遺伝子については本邦固有の E32K バリエントが病的バリエントとして報告されている (Noguchi et al. *Atherosclerosis*, 2010)。我々は、国立循環器病研究センターにて FH 患者に対し日常臨床において *LDLR* 及び *PCSK9* 遺伝子解析を実施している。その中で、*PCSK9* 遺伝子 V4I バリエントと *LDLR* 遺伝子バリエントの両方を有する患者は、*LDLR* 遺伝子バリエントのみを有する患者に比較し、LDL-C 値の上昇とともに冠動脈疾患の発症頻度が 40%も上昇することを報告した (Ohta, Hori et al. *JCL*, 2016)。しかしながら、*PCSK9* 遺伝子 V4I バリエントの FH の病態への寄与は明らかではない。また、本邦固有の *PCSK9* 遺伝子 V4I・E32K バリエントが存在するドメインは、海外で FH の原因とされる *PCSK9* 遺伝子病的バリエントの存在するドメインと大きく異なる。これらのことから、*PCSK9* 遺伝子の V4I・E32K バリエントは、*PCSK9* 蛋白質の LDLR 分解機構が海外の病的バリエントと異なり、FH の病態修飾因子として機能することが示唆され、LDLR 分解以外の未知の機能を有する可能性も考えられる。

一方 *PCSK9* 蛋白質は、血中では「成熟型」と「切断型」の 2 種類の分子型で存在する。「成熟型」*PCSK9* は LDLR 分解活性を有するが、「切断型」*PCSK9* は LDLR 分解活性が非常に低い。「切断型」*PCSK9* の存在意義は不明であること、血中の両分子型の簡便な分離測定法は存在しないことから、我々は、「成熟型」と「切断型」*PCSK9* を分けて測定可能な ELISA 法を開発した (Hori et al. *JCEM*, 2015)。また、*PCSK9* の分子型の制御機構は明らかになっていない。

2. 研究の目的

PCSK9 遺伝子バリエントや分子型が FH 及び生活習慣病の発症・進行に及ぼす影響とそのメカニズムについて、さらには *PCSK9* の分子型の制御機構について、動物モデル、臨床検体、培養細胞を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

1) *PCSK9* 遺伝子 V4I 及び E32K バリエントの *in vitro* 機能解析

PCSK9 遺伝子野生型、V4I、E32K バリエントを有するプラスミドをヒト培養胎児腎細胞 HEK293 ならびにヒト培養肝細胞 HepG2 に導入し、*PCSK9* 蛋白質の細胞外分泌量及び細胞内発現量、LDLR の発現量をウエスタンブロットにより測定する。各細胞における脂質・糖代謝関連の遺伝子発現について RT-PCR により検討する。また、培養液に DiI-LDL を添加し取り込み量を測定する。

2) FH 患者における *PCSK9* 遺伝子バリエントの意義付けと表現型の解析

我々は全国の FH・FH 疑い患者に対し、日常臨床としてサンガー法/MLPA 法を用いて *LDLR*・*PCSK9* 遺伝子解析を実施している。当院/全国の FH 患者 801 名について、遺伝子型と臨床データの解析により検出されたバリエントについて ACMG ガイドラインに従ってアノテーションを行い、遺伝子型と臨床データについて解析した。

4. 研究成果

1) PCSK9 遺伝子 V4I・E32K バリエントの *in vitro* 機能解析

PCSK9 遺伝子野生型、V4I、E32K バリエントを有するプラスミドを製作し、ヒト培養胎児腎細胞 HEK293 に導入したところ、PCSK9 蛋白質の細胞内発現量・細胞外分泌量は、野生型と比較したところ各バリエントにおいて差は認められなかった。また、ヒト培養肝細胞

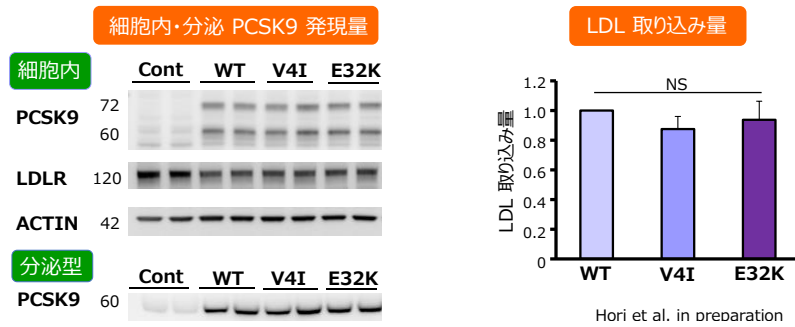


図1 本邦固有の PCSK9 バリエントの HepG2 細胞を用いたアッセイ

細胞 HepG2 に各プラスミドを導入した場合も PCSK9 の発現・分泌量はバリエント間で差は認められず、LDLR の細胞内・細胞膜上の発現量や LDL の取り込みについても差は認められなかった (図1)。これらのことから、PCSK9 蛋白質の V4I 及び E32K 変異体は、PCSK9 野生型と同程度に合成され細胞外に分泌され、LDLR 調節作用を有することが示唆された (Hori et al. in preparation)。PCSK9 遺伝子 V4I・E32K バリエントの存在する部位は、マウスではアミノ酸配列がヒトの配列と一致しない。PCSK9 遺伝子 E32K バリエントについては野生型に比較して PCSK9 の細胞外分泌量の増加が認められることも報告されていることから (Noguchi et al. Atherosclerosis, 2010)、実験条件の検討などさらなる解析が必要である。また、培養肝細胞の LDLR 活性は正常であることから、LDLR 遺伝子バリエントを有する患者における PCSK9 遺伝子 V4I・E32K バリエントの FH の病態への寄与は不明である。そこで、マウスモデルを用いるのではなく、患者の末梢血から iPS 細胞を樹立する技術を確立し、LDLR 遺伝子バリエントと PCSK9 遺伝子 V4I バリエントの両方を有する家系について、iPS 細胞由来の肝細胞の機能解析のため、研究同意を取得して iPS 細胞を樹立している。

2) FH 患者における PCSK9 遺伝子バリエントの意義付けと表現型の解析

当院/全国の FH 患者 801 名について、LDLR・PCSK9 遺伝子解析結果と臨床データとの解析により検出されたバリエントについて検討したところ、92 種類の LDLR 遺伝子バリエントならびに 4 種類の PCSK9 遺伝子バリエントが病的バリエントであることを明らかにした (Hori et al. Atherosclerosis, 2019)。本邦の FH 患者では、PCSK9 遺伝子 V4I・E32K バリエントが高頻度に検出される。PCSK9 遺伝子 E32K バリエントは日本の一般人口に比較して FH 患者においてアリル頻度の上昇が認められたが、PCSK9 遺伝子 V4I バリエントは FH 患者においてはアリル頻度の低下が認められた (表1)。また、PCSK9 遺伝子 V4I バリエントの有無により FH の病態に差は認められなかったことに加え、PCSK9 遺伝子 V4I バリエントを有する家

エクソン No.	機能ドメイン	ヌクレオチド変化	アミノ酸変化	FH 患者におけるアリル頻度	日本の一般人口におけるアリル頻度*
1	Signal peptide	c.10G>A	p.V4I	0.007	0.014**
1	Pro-domain	c.94G>A	p.E32K	0.035	0.011***

*ToMMo4.7KJPN : Japanese genome variation database
P<0.05 *P<0.001 based on the Fisher's Exact Test

表1 本邦固有の PCSK9 遺伝子バリエントのアリル頻度

系の病態解析から、*PCSK9* 遺伝子 V4I バリエントは単独では FH の病態に寄与しないことを明らかにした (Hori et al. *Atherosclerosis*, 2019)。さらに、20 歳以上の FH 患者 724 例の中から、糖尿病と *PCSK9* 遺伝子 V4I・E32K バリエントとの関連について検討した。その結果、*LDLR* 遺伝子バリエントならびに *PCSK9* 遺伝子 V4I・E32K バリエントを認めない患者群 (n=248) では糖尿病罹患者の割合が 19%であることに對し、*PCSK9* 遺伝子 E32K バリエントを有する患者群 (*LDLR*・*PCSK9* バリエントを認めない患者群:n=49) では 2% (p<0.01 vs *LDLR*・*PCSK9* バリエントを認めない患者群)、V4I バリエントを有する患者群 (n=9) では 0%であった。*LDLR* 遺伝子バリエントを有する患者群 (n=412) においても糖尿病罹患者の割合は 8.3% (p<0.0001 vs *LDLR*・*PCSK9* バリエントを認めない患者群) であることから、*LDLR* 遺伝子バリエントや *PCSK9* 遺伝子バリエントを有する患者群では *LDLR*・*PCSK9* バリエントを認めない患者群に比較して糖尿病罹患率が低下していた。これらのことから、*LDLR*・*PCSK9* 遺伝子バリエントを有する患者ではバリエントを認めない患者に對し、糖尿病リスクが低いことが示唆された。また、*PCSK9* 遺伝子 E32K バリエントは FH の病態に寄与するが、FH の特徴であるアキレス腱肥厚の頻度については、*LDLR* 遺伝子バリエント群では 77% であることに對し、*PCSK9* 遺伝子 E32K バリエント群では 44% (p<0.01 vs *LDLR* 遺伝子バリエントを有する患者群) と低く、LDL-C 値の上昇も *LDLR* 遺伝子バリエント群に比較して軽度であることから、FH と診断されにくい。しかしながら、*PCSK9* 遺伝子 E32K バリエントは日本人の一般人口において冠動脈疾患リスクとなることが報告されていること (Tajima et al. *Sci. Rep.* 2018) から、FH 遺伝子解析を実施し、冠動脈疾患リスクの高い患者を早期に発見することが重要であると考えられる。また、FH 発端者 232 名に對しては、LDL-C 値が管理されているにもかかわらず、*LDLR* 遺伝子バリエントに *PCSK9* 遺伝子 V4I バリエントもしくは E32K バリエントが重なることにより予後不良となることが明らかになった (Doi, Hori, et al. submitted)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hori M, Takahashi A, Son C, Ogura M, Harada-Shiba M	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 The first Japanese cases of familial hypercholesterolemia due to a known pathogenic APOB gene variant, c.10580G>A: p.(Arg3527Gln).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Lipidology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacl.2020.05.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tada H*, Hori M*(equal contribution), Nomura A, Hosomichi K, Nohara A, Kawashiri M*, Harada-Shiba M*	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 A catalogue of the pathogenic mutations of LDL receptor gene in Japanese familial hypercholesterolemia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Lipidology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacl.2020.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hori M*(corresponding author), Takahashi A, Son C, Ogura M, Harada-Shiba M*	4. 巻 -
2. 論文標題 The benign c.344G>A: p.(Arg115His) variant in the LDLR gene interpreted from a pedigree-based genetic analysis of familial hypercholesterolemia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lipids in Health and Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12944-020-01252-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hori M* (corresponding author), Ohta N, Takahashi A, Masuda H, Isoda R, Yamamoto S, Son C, Ogura M, Hosoda K, Miyamoto Y, Harada-Shiba M*	4. 巻 289
2. 論文標題 Impact of LDLR and PCSK9 Pathogenic Variants in Japanese Heterozygous Familial Hypercholesterolemia Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 101-108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.atherosclerosis.2019.08.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takafuji Y, Hori M (corresponding author), Mizuno T, Harada-Shiba M	4. 巻 115
2. 論文標題 Humoral Factors Secreted From Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Atherosclerosis in Ldlr-/- Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cardiovascular Research	6. 最初と最後の頁 1041-1051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cvr/cvy271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hori M* (corresponding author), Miyauchi E, Son C, Harada-Shiba M*	4. 巻 13
2. 論文標題 Detection of the Benign c.2579C>T (p.A860V) Variant of the LDLR Gene in a Pedigree-Based Genetic Analysis of Familial Hypercholesterolemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Lipidology	6. 最初と最後の頁 335-339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacl.2019.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita T, Takayama K, Hori M, Harada-Shiba M, Mizuguchi H	4. 巻 42
2. 論文標題 Pharmaceutical Research for Inherited Metabolic Disorders of the Liver Using Human Induced Pluripotent Stem Cell and Genome Editing Technologies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological & pharmaceutical bulletin	6. 最初と最後の頁 312-318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00544	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nose D, Hori M, Miyamoto Y, Imaizumi S, Harada-Shiba M, Saku K, Miura S	4. 巻 19
2. 論文標題 Discontinuation of LDL apheresis with evolocumab in an FH patient with a duplication of exon 2-6 in the LDLR gene.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology Cases.	6. 最初と最後の頁 55-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jccase.2018.10.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirahama R, Ono T, Nagamatsu S, Sueta D, Takashio S, Chitose T, Fujisue K, Sakamoto K, Yamamoto E, Izumiya Y, Kaikita K, Hokimoto S, Hori M, Harada-Shiba M, Kajiwara I, Ogawa H, Tsujita K	4. 巻 57
2. 論文標題 A case of coronary artery plaque regression by a PCSK9 antibody and rosuvastatin in double-heterozygous familial hypercholesterolemia with an LDLR mutation and a PCSK9 V4I mutation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 3551-3557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.1060-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Michikura M, Ogura M, Yamamoto M, Sekimoto M, Fuke C, Hori M, Arai K, Kihara S, Hosoda K, Yanagi K, Harada-Shiba M	4. 巻 81
2. 論文標題 Use of Achilles tendon ultrasonography for diagnosis of familial hypercholesterolemia among Japanese subjects	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1879-1885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-17-0041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Y, Hori M* (corresponding author), Nakagami T, Harada-Shiba M*, Uchigata Y	4. 巻 12
2. 論文標題 Glucagon-like peptide-1 receptor agonists reduced the LDL-cholesterol in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus treated with statins.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Lipidology	6. 最初と最後の頁 62-69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacl.2017.11.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 堀美香、斯波真理子
2. 発表標題 家族性高コレステロール血症の遺伝子解析とその有用性
3. 学会等名 第67回日本心臓病学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hori M, Harada-Shiba M.
2. 発表標題 Role of PCSK9 as a modifier in familial hypercholesterolemia.
3. 学会等名 第50回日本動脈硬化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Doi T, Hori M, Harada-Shiba M, Kataoka Y, Nishikawa R, Tsuda K, Nishimura K, Ogura M, Noguchi T, Yasuda S.
2. 発表標題 Prevalence, Clinical Characteristics and Cardiovascular Outcomes in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia Patients with Double-heterozygous Mutation of LDLR and PCSK9 Gain-of-function Mutation.
3. 学会等名 American Heart Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小倉正恒, 堀美香, 斯波真理子
2. 発表標題 FHホモ接合体におけるコレステロール引き抜き能
3. 学会等名 第50回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀美香, 太田直孝, 増田弘明, 磯田理恵子, 孫徹, 小倉正恒, 細田公則, 宮本恵宏, 斯波真理子
2. 発表標題 家族性高コレステロール血症ヘテロ接合体における遺伝子診断とLDLR/PCSK9遺伝子変異の分布
3. 学会等名 第55回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hori M, Ohta N, Masuda H, Son C, Hosoda K, Ogura M, Miyamoto Y, Harada-Shiba M
2. 発表標題 The frequency and the spectrum of causative mutations in Japanese familial hypercholesterolemia heterozygotes
3. 学会等名 86th European Atherosclerosis Society Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hori M, Ohta N, Masuda H, Ogura M, Makino H, Tamanaha T, Miyamoto Y, Harada-Shiba M
2. 発表標題 The frequency and the spectrum of FH causing mutations in Japanese heterozygous familial hypercholesterolemia
3. 学会等名 第49回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 太田直孝、堀美香、宮本恵宏、斯波真理子	4. 発行年 2018年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 6
3. 書名 The Lipid	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----