

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19038

研究課題名(和文) PCSK9の形態が家族性高コレステロール血症や肥満・糖尿病に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Involvement of the type of PCSK9 in familial hypercholesterolemia, obesity and diabetes

研究代表者

堀 美香 (Mika, Hori)

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：家族性高コレステロール血症(FH)において、PCSK9 V4I変異は単独ではFHの病態を呈さないが、LDL受容体(LDLR)変異と重なることにより、LDLR変異単独に比し、LDL-コレステロール(LDL-C)値の上昇ならびに冠動脈疾患の頻度の上昇が認められた。ヒト肝細胞を用いて、PCSK9 V4Iの機能解析を実施したところ、野生型と比較してLDLの取り込みやLDLRの発現量に差は認められなかったが、ある条件下では、LDLの取り込みが有意に低下した。高コレステロール血症においては、切断型PCSK9の割合とAPOB濃度が負に相関していた。

研究成果の概要(英文)：In familial hypercholesterolemia, there were no significant differences in serum lipid levels and the prevalence of coronary artery diseases (CADs) between PCSK9 V4I carriers and non-carriers without LDLR mutations. In the patients carrying LDLR mutations and aged 30 years or more, the additional PCSK9 V4I variant is linked to a significantly increased prevalence of CADs in accord with the elevation of the LDL-C level. In vitro experiments, there were no differences in the expression of LDLR and the uptake of LDL between PCSK9 V4I-expressed cells and PCSK9 WT-expressed cells. However, in a setting, the uptake of LDL was significantly decreased in PCSK9 V4I-expressed cells as compared with PCSK9 WT-expressed cells.

In addition, there was inverse correlation between ratio of furin-cleaved PCSK9 to total PCSK9 and serum APOB level in patients with hypercholesterolemia. Thus, it is suggested that the rate of mature PCSK9 to total PCSK9 is associated with high LDL-C levels.

研究分野：分子生物学

キーワード：PCSK9 変異 分子型 LDL-コレステロール 家族性高コレステロール血症

## 1. 研究開始当初の背景

家族性高コレステロール血症 (FH) は常染色体優性遺伝性疾患であり、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。FH の原因遺伝子としては、LDL 受容体 (LDLR)、ApoB が報告されていたが、2003 年 Abifadel らにより第三の原因遺伝子として proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) が発見された (Abifadel et al. Nat Genet, 2003)。PCSK9 は細胞内コレステロールプールの減少により、転写因子 SREBP2 の活性化を介して誘導され、LDLR の分解を促進する。PCSK9 遺伝子の機能亢進型変異では、FH の病態を呈するが、機能欠損型変異では、LDL-C の低下に加え、冠動脈疾患の発症率が 88% も低下した (Cohen et al. NEJM, 2006) ことから、PCSK9 をターゲットとした抗体医薬等のコレステロール低下薬の開発が世界中で進行している。血中 PCSK9 は、LDL-C、トリグリセリド、血糖値等のようなメタボリックシンドロームの因子と相関することも報告されている (Baass A et al. Clin Chem, 2009)。PCSK9 は、692 アミノ酸からなるセリンプロテアーゼであり、血中では、「成熟型」と細胞内の酵素 furin によって分解された「切断型」の 2 種類が存在する「成熟型」は LDLR 分解活性を有するが、「切断型」は LDLR 分解活性を有しないことが報告されているが (Benjannet S et al. JBC, 2006; Han B et al. JBC, 2014)、「切断型」の存在意義については明らかになっていない。しかしながら、「切断型」のみを特異的に分けて測定する方法が存在しなかったため、申請者らは、「成熟型」と「切断型」を分けて測定できる ELISA 法を開発した。申請者らは、重篤な FH 患者に適用される LDL を除去するための LDL アフェレシス治療において、この ELISA 法を用いて、治療前後の血清中の「成熟型」及び「切断型」PCSK9 値を測定し、約 50% 除去されることを明らかにした (Hori, et al. JCEM, 2015)。この LDL 除去メカニズムについて明らかにするために、PCSK9 のゲル濾過クロマトグラフィー及び apoB の共免疫沈降を行った。その結果、血中 PCSK9 の 20% は apoB (LDL) と結合し、残り 80% は何らかのパートナー蛋白質と結合して存在し、LDL アフェレシスにより除去されることが明らかになった。

## 2. 研究の目的

本研究では、「切断型」PCSK9 や apoB 結合 PCSK9 のような結合蛋白質を含めた PCSK9 の形態が FH 及びメタボリックシンドロームのような病態に及ぼす影響とそのメカニズムについて明らかにすることを目的とした。このため、スタチンの PCSK9 の形態への影

響の検討、FH 患者における「成熟型」「切断型」の検討を行った。次に、PCSK9 遺伝子変異と形態について検討するための基礎データとして、PCSK9 遺伝子変異の検索、PCSK9 変異体の機能解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) スタチンの PCSK9 の形態への影響の検討

当センターを受診した高コレステロール血症患者 10 名に対し、アトルバスタチン 5 mg の服用前と服用 3 ヶ月後の 2 回の採血で得られた血清から ELISA により「成熟型」及び「切断型」PCSK9 を測定した。また、未治療時の TC、LDL-C、APOB、HDL-C やスタチン投与後の変化率と PCSK9 の形態との関連について検討した。

### (2) FH 患者血清中の「成熟型」「切断型」PCSK9 の測定と血中における PCSK9 結合タンパク質の検索

当センターを受診した FH 患者 174 名の血清を用いて、ELISA により「成熟型」及び「切断型」PCSK9 を測定した。また、PCSK9 が血中で、HDL やアルブミンと結合しているか否か調べるため、ApoAI 及びアルブミン抗体を用いて共免疫沈降を行った。

### (3) FH 患者における PCSK9 遺伝子変異の検索

PCSK9 の形態と遺伝子変異との関連を調べる目的で、当センターを受診した FH ヘテロ接合体に対し、PCSK9 遺伝子の全コーディング領域について、当センターの遺伝子検査室にてサンガー法により遺伝子解析を実施した。

### (4) PCSK9 変異体の in vitro 機能解析

(3) で検出された PCSK9 変異体の機能解析を行うために、各変異を有するプラスミドを作製し、HepG2 細胞に導入し、LDL の取り込み量や LDLR 発現量を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) スタチンの PCSK9 の形態への影響の検討

高コレステロール血症患者において、血清 LDL-C 値は、スタチン投与後に約 40% 低下したが ( $p < 0.0001$ )、「成熟型」及び「切断型」PCSK9 量は、投与前後で差は認められなかった。また、未治療時において、血清中の成熟型 PCSK9 と血清 APOB、LDL-C、TC、HDL-C、ApoAI との相関を調べたところ、各相関係数は  $r = 0.52$  ( $p = 0.12$ )、 $r = 0.52$  ( $p = 0.12$ )、 $r = 0.53$  ( $p = 0.12$ )、 $r = -0.27$  ( $p = 0.44$ )、 $r = -0.27$  ( $p = 0.46$ ) であった。また、スタチン投与によ

る成熟型 PCSK9 変化率と LDL-C 変化率の相関係数は、 $r=0.36$  ( $p=0.31$ ) であり、切断型 PCSK9 変化率と LDL-C 変化率の相関係数は、 $r=0.41$  ( $p=0.24$ ) であった。また、未治療時の PCSK9 切断型の割合と LDL-C 値の相関係数は  $r=-0.54$  ( $p=0.1$ ) であり、未治療時の PCSK9 切断型の割合と APOB 値は負に相関することが明らかになった ( $r=-0.73$ ,  $p=0.02$ )。このことから、PCSK9 の切断型の割合が高いほど、APOB や LDL-C は高くなる可能性がある。PCSK9 の分子型と LDL-C 値との関連については、測定数を増やして検討する必要がある。

(2) FH 患者における「成熟型」「切断型」PCSK9 の測定結果と血中における PCSK9 結合タンパク質の検索

各血清 PCSK9 の平均値は、「成熟型」 $300 \pm 138$  mg/mL、「切断型」 $70 \pm 76$  mg/mL であり、PCSK9 全体に対する切断型 PCSK9 の割合は、平均で 20% であった。血中の PCSK9 結合タンパク質として、HDL に着目し、一部の FH 患者血清を用いて、ApoA-I の共免疫沈降を行ったが、PCSK9 との結合は認められなかった。ApoE やアルブミンの共免疫沈降も実施したが、免疫沈降がうまくいかず、HDL と PCSK9 の結合の有無については、結論を出すことができなかった。

(3) FH 患者における PCSK9 遺伝子変異の検索

当センターを受診した血縁関係のない FH 患者 224 名において、PCSK9 変異については、A53V 変異 (FH 患者全体の 8%)、E32K 変異 (FH 患者全体の 6.3%)、V4I 変異 (FH 患者全体の 6.3%) が高頻度に検出された。各変異の有無により、未治療 LDL-C、HDL-C、TG や冠動脈疾患の頻度に差は認められなかった。しかしながら、PCSK9 V4I 変異と LDLR 変異の組み合わせでは、LDLR 変異単独に比較して未治療 LDL-C 値の上昇に加え、FH の冠動脈疾患の発症頻度が 30% も上昇することが明らかになった。このことから、PCSK9 V4I 変異は、単独では FH の病態を呈さないが、LDLR 変異と重なることにより、FH の病態を重症化させることが示唆された。

(4) PCSK9 変異体の in vitro 機能解析

PCSK9 WT、E32K、V4I プラスミドをヒト培養肝細胞 HepG2 に過剰発現させたところ、PCSK9 蛋白質の細胞内及び細胞外分泌量に差は認められなかった。また、LDLR の発現及び DiI-LDL の取り込みについてフローサイトメトリーを用いて確認したが、WT に比較して、E32K 変異体、

V4I 変異体発現細胞において差は認められなかった。しかしながら、ある条件では、WT に比較して、V4I 変異体及び E32K 変異体発現細胞において、LDL の取り込みが有意に低下することが明らかになった。今後は、各 PCSK9 変異体が LDL の取り込みに影響を与えるメカニズムについて詳細に検討するとともに、FH の病態に PCSK9 の変異が与える影響について、LDL の代謝だけではなく、VLDL の代謝、糖尿病等の他の生活習慣病との関連も含め、検討していく予定である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Michikura M, Ogura M, Yamamoto M, Sekimoto M, Fuke C, Hori M, Arai K, Kihara S, Hosoda K, Yanagi K, Harada-Shiba M: Use of Achilles tendon ultrasonography for diagnosis of familial hypercholesterolemia among Japanese subjects. *Circ J*. in press 査読有

Kataoka Y, Harada-Shiba M, Nakao K, Nakashima T, Kawakami S, Fujino M, Kanaya T, Nagai T, Tahara Y, Asaumi Y, Hori M, Ogura M, Goto Y, Noguchi T, Yasuda S: Mature proprotein convertase subxilisins/kexins Type 9, coronary atheroma burden and vessel remodeling in heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol*. 2017; 11: 413-421. doi:10.1016/j.jacl.2017.01.005. 査読有

Ohta N\*, Hori M\*†, Takahashi A, Ogura M, Makino H, Tamanaha T, Fujiyama H, Miyamoto Y, Harada-Shiba M†(\*equal contribution, †corresponding author): Proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) V4I variant with LDLR mutations modifies the phenotype of familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol*. 2016; 10:547-555. doi: 10.1016/j.jacl.2015.12.024. 査読有

Ogura M, Hori M, Harada-Shiba M: Association between cholesterol efflux capacity and atherosclerotic cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016; 36:181-188. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306665. 査読有

Hori M, Mutoh M, Imai T, Nakagama H, Takahashi M: Possible involvement of pancreatic fatty infiltration in pancreatic carcinogenesis. *JOP*, 2016; 17: 166-175. 査

〔学会発表〕(計 14 件)

Harada-Shiba M, Hori M, Kataoka Y, Ogura M, Treatment of Familial Hypercholesterolemia, 第 81 回日本循環器学会学術集会, 2017 年 3 月 17 日~19 日, 石川県立音楽堂他 (金沢)

堀美香, 南野直人, 斯波真理子, LDL アフェレシスにより除去されるタンパク質の解析 - FH と末梢動脈疾患 -, 第 37 回日本アフェレシス学会学術大会, 2016 年 11 月 25 日~27 日, パシフィコ横浜会議センター(横浜)

太田直孝, 堀美香, 増田弘明, 藤山啓美, 新井浩司, 宮本恵宏, 斯波真理子, PCSK9 V4I 変異と E32K 変異を有する家系について, 第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2016 年 7 月 14 日~15 日, 京王プラザホテル(東京)

小倉正恒, 森本めぐむ, 太田愛美, 道倉雅仁, 堀美香, 斯波真理子, 家族性高コレステロール血症の残余リスクとしての HDL 機能, 第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2016 年 7 月 14 日~15 日, 京王プラザホテル(東京)

小倉正恒, 堀美香, 榎野久士, 玉那覇民子, 斯波真理子, 家族性高コレステロール血症ホモ接合体 Up to date, 第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2016 年 7 月 14 日~15 日, 京王プラザホテル(東京)

Hori M, Ohta N, Takahashi A, Ogura M, Makino H, Tamanaha T, Miyamoto Y, Harada-Shiba M, Proprotein convertase subtilisin/kexin9 (PCSK9) V4I variant with LDLR mutations modifies the phenotype of heterozygous familial hypercholesterolemia, 84<sup>th</sup> EAS Congress, 2016 年 5 月 29 日~6 月 1 日, Innsbruck, Austria

Hori M, Ohta N, Makino H, Tamanaha T, Kawano Y, Miyamoto Y, Harada-Shiba M, Role of proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) variants in Japanese heterozygous familial hypercholesterolemia, XV International Symposium on Atherosclerosis 2015, 2015 年 5 月 2 日~26 日, Amsterdam

Ogura M, Morimoto M, Hori M, Harada-Shiba M, Cholesterol Efflux Capacity in Patients with Familial Hypercholesterolemia, XV International Symposium on Atherosclerosis 2015, 2015 年 5 月 23 日~26 日, Amsterdam

岩崎忠雄, 石原光昭, 鯨岡健, 小川一行,

服部浩明, 堀美香, 斯波真理子, 新規分子非ヘテロダイマー型 60kDa PCSK9 特異的 ELISA の構築と血中動態, 第 47 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2015 年 7 月 9 日~10 日, 仙台国際センター・新展示施設 (仙台)

Ohta N, Hori M, Makino H, Masuda H, Fujiyama H, Tamanaha T, Miyamoto Y, Harada-Shiba M, Combination of LDL receptor adaptor protein 1 (LDLRAP1) and PCSK9 mutations shows severe clinical phenotype in heterozygous familial hypercholesterolemia, 第 47 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2015 年 7 月 9 日~10 日, 仙台国際センター・新展示施設 (仙台)

Hori M, Ohta N, Ogura M, Makino H, Tamanaha T, Miyamoto Y, Harada-Shiba M, Proprotein convertase subtilisin/kexin 9(PCSK9) variants in Japanese heterozygous familial hypercholesterolemia, 第 47 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2015 年 7 月 9 日~10 日, 仙台国際センター・新展示施設 (仙台)

小倉正恒, 道倉雅仁, 富家千鶴, 堀美香, 森本めぐむ, 斯波真理子, 家族性高コレステロール血症の残余リスクとしての LDL 粒子の質的評価, 第 47 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2015 年 7 月 9 日~10 日, 仙台国際センター・新展示施設 (仙台)

Hori M, Ohta N, Makino H, Tamanaha T, Kishimoto I, Kawano Y, Miyamoto Y, Harada-Shiba M, Role of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9(PCSK9) Variants in Japanese Heterozygous Familial Hypercholesterolemia, 第 79 回日本循環器学会学術集会, 2015 年 4 月 24 日~26 日, 大阪国際会議場 (大阪)

Hori M, Yuasa Y, Makino H, Yanagi K, Tamanaha T, Kishimoto I, Hattori H, Harada-Shiba M, Removal of Plasma Mature and Furin-cleaved Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9(PCSK9) by LDLapheresis in Familial Hypercholesterolemia with or without ApoB, 第 79 回日本循環器学会学術集会, 2015 年 4 月 24 日~26 日, 大阪国際会議場 (大阪)

〔図書〕(計 1 件)

堀美香, 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症診断・治療の新たな展開—PCSK9 を中心として— 『循環器病研究の進歩』 56 号, 81-87, 協和企画, 2016 年 11 月

## 6 . 研究組織

(1)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・病態代謝部・動脈硬化研究室・室長

研究者番号：60598043