

平成22年 5月14日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790642
 研究課題名（和文） 家族性高コレステロール血症における構造多型を含めた遺伝的背景の網羅的解明と治療
 研究課題名（英文） Analysis of the genetic backgrounds of familial hypercholesterolemia to achieve the effective therapy.
 研究代表者
 野口 徹 (NOGUCHI TOHRU)
 金沢大学・医学系研究科・特任助教
 研究者番号：40456421

研究成果の概要（和文）：従来法では家族性高コレステロール(FH)症例の約4割で遺伝子変異が未検出である。そこで、大規模欠失・重複変異(CNV)を簡便に検出可能なMLPA法を新たに導入し、FHと臨床診断された518例の病因遺伝子変異を検索した。MLPA法導入で新たに8種のCNVが検出され、本施設における未解決症例は27%に減少した。さらに、PCSK9遺伝子変異がFHの臨床像に及ぼす影響についても明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we introduced the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) to detect copy number variations (CNVs) of the low-density lipoprotein receptor gene in 518 familial hypercholesterolemia (FH) subjects. As the result of this research, 8 CNVs were newly identified and the mutation detection rate was improved from 63.5% to 73.0%. Furthermore, we revealed the effects of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 gene mutations on the clinical phenotype of FH.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：遺伝性脂質代謝異常

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：家族性高コレステロール血症, LDL受容体, MLPA法, apoB-100, PCSK9, インバーダーアッセイ法, 遺伝子大規模欠失・重複変異

1. 研究開始当初の背景

家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia, FH) は低比重リポタンパク質受容体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 遺伝子異常を原因とする常

染色体優性遺伝性疾患で、高コレステロール血症、腱黄色腫、早発性冠動脈硬化症を主徴とする。ヘテロ接合体性FHは500人に1人以上の頻度で存在し、最も頻度の高い遺伝性疾患の一つに挙げられる。FHは早期に適切な診断と治療がなされなければ心臓死に到る

危険性が極めて高く、小児期より積極的に薬物療法を開始すべき疾患との声明が米国心臓病学会より出された(McCrindle BW et al. *Circulation* 2007). しかしながら、FH 患者の約 4 割は黄色腫を伴わず、臨床像での診断には限界がある。一方で臨床的に FH と診断された症例の 3~5 割は、従来の SSCP 法、DGGE 法、サザンブロット法を中心とした検出法では遺伝子変異が同定できていなかった。また、FH と診断された 4 割にしかスタチンが投与されておらず、さらにその 2 割しか治療目標に達していないなど(Bates TR et al. *Heart Lung Circ.* 2007), FH の診断と治療には課題が多い。そこで、イギリスやオランダなどで提唱されているように、FH が疑われる家系に対しては、遺伝子による迅速かつ確実な診断を行い、早期から適切な脂質低下療法に結びつけることが、合併症である心疾患を防ぐ上でも極めて重要であると考えた。

FH の主な原因遺伝子は LDLR であるが、LDLR のリガンドであるアポリポ蛋白 B-100 (apoB-100) の遺伝子変異によっても FH と同様の臨床像を来し、FDB (familial defective apolipoprotein B-100) と呼ばれる。第二の FH とも言うべき FDB の大多数は R3500Q 変異であり、東欧を中心に分布する。アジアにおいては R3500W が比較的高頻度である。日本人では、FDB の原因となる変異が集中しているコドン R3500 周辺、および LDLR との結合に関与する領域に変異は確認されていない。さらに、LDLR、apoB-100 に加えて PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) 遺伝子変異も FH 様症状の病因となることが注目され始めた。PCSK9 はセリンプロテアーゼの一種で、主に肝臓において LDLR の分解を亢進し、細胞膜表面の LDLR 量を低下させる。そのため、機能亢進型変異では高脂血症を、欧米で高頻度の機能喪失型変異では低脂血症を来す。日本人においても PCSK9 遺伝子が検討されつつあるが、海外で報告されているような高頻度の機能的変異は報告されていなかった。

FH 200 例を対象とした我々の以前の検討では、37 種の LDLR 遺伝子変異が 127 例で検出されたが(Yu W et al. *Atherosclerosis*. 2002), 他施設と同様に約 4 割については病因遺伝子変異が明らかにならなかった。その後、点変異に基づく個人間の遺伝情報の差はわずか 0.1% と推定され、遺伝子大規模欠失・重複変異 (copy number variation, CNV) を含む構造的多型ではその 2~5 倍高いと報告された(Korbel JO et al. *Science*. 2007; 318: 420-426). 点変異検出系のインバーダーアッセイ法(IVA)と同原理を用いたコピーナンバーアッセイ法による我々の予備検討では、LDLR 遺伝子に新たな CNV を有する症例が存在する可能性が示唆された。CNV は従来

法では検出が困難であったが、MLPA 法 (multiplex ligation-dependent probe amplification) が開発されたことによって、より効率的かつ簡便な検出が可能となった。

現在行っている IVA 法に加えて MLPA 法を確立し、FH の病因遺伝子変異を迅速に同定可能になれば、臨床所見での診断が困難であった FH もかなりの症例が確実に診断できるようになる。これにより、FH 患者の適切な治療が選択され、予後の改善につながると考えた。さらに、コレステロール調節に関与する SREBP-2 (sterol-regulatory element-binding protein) や SCAP (SREBP cleavage-activating protein) などの遺伝子の一塩基多型 (SNP) の組み合わせで FH 症例の臨床像が修飾されることが示され始めたことから (Durst R et al. *Atherosclerosis*. 2006; 189: 443-50), 遺伝的背景を均一とした FH において臨床像を修飾する遺伝因子についても検討を加えるものとした。FH は動脈硬化促進モデルといえる疾患であり、FH において明らかとなった促進因子は、FH 以外のより一般的な動脈硬化症進展にも関与すると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、MLPA 法を確立し、従来から行っているインバーダーアッセイ法(IVA)とあわせ、FH 患者の原因遺伝子変異を迅速かつ確実に同定するアッセイ系を構築することを目指した。具体的には、新たに臨床診断された FH 症例を対象として LDLR 遺伝子の点変異および CNV を検索し、また、LDLR と同様にその遺伝子変異で脂質異常症を来す apoB-100 や PCSK9 遺伝子についても徹底的に変異を検索し、その臨床像・治療効果の違いを明らかにして、病因変異に基づいた遺伝性高脂血症治療に結びつけることを目的とした。さらに、遺伝的背景を明らかにした FH 症例を対象として脂質値や動脈硬化進展を修飾する遺伝因子を検討し、臨床像との関連性についても考察するものとした。

当研究講座は脂質研究を専門としており、極めて稀な症例であるホモ接合体 FH 患者を 18 例、ヘテロ接合体 FH 患者を 1500 例以上集めて治療してきた。その大半は継続して通院しており、変異の同定後には、複数の家系で長期的に治療効果の検討を行うことが可能である。この利点を生かして、治療効果や副作用出現の予測など、遺伝情報を基にしたテーラーメイド医療の発展に大きく寄与し、副作用などによる医療費の大幅低減に貢献することを目標とした。

3. 研究の方法

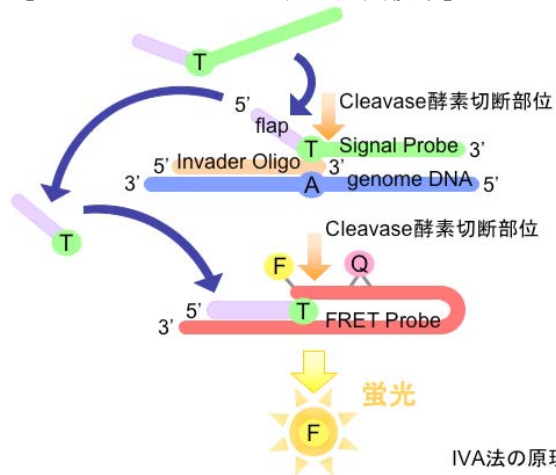
臨床的に FH と診断された症例 518 例を対

象として、病因遺伝子変異検索を行った。まず日本人で報告のある LDLR 遺伝子変異 46 種類について、従来から行っているインバーダーアッセイ法 (IVA) を用いてまとめて検索した。その後、新たに確立した MLPA 法により LDLR 遺伝子の CNV を検出し、LDLR 遺伝子変異の初期スクリーニングを完了した。さらに、高コレステロール血症者において比較的高い頻度で検出される PCSK9 遺伝子 E32K 変異についても、全例を対象として制限酵素断片長多型解析 (Restriction Fragment Length Polymorphism) による検索を行った。

未だ変異が検出されない症例については、直接塩基配列決定法 (direct sequencing) を用い、LDLR 遺伝子の全 18 エクソンについて再精査を進めるとともに、apoB-100 遺伝子のうち LDLR との結合に関与するとされている領域(主にエクソン 26 および 29)ならびに PCSK9 遺伝子の全 12 エクソンで変異の検索を進めた。

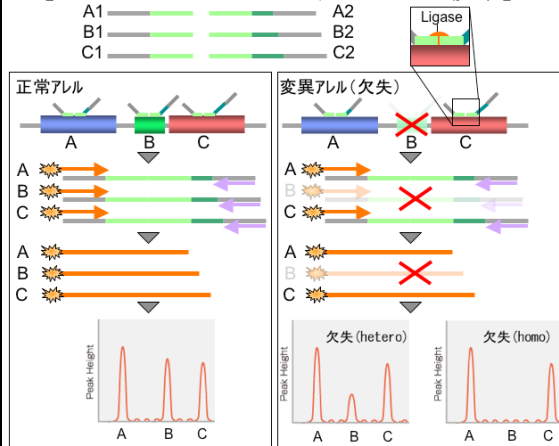
変異が確定された症例に関しては、同一家系内に存在する臨床診断 FH 症例の変異確認も行った。PCSK9 遺伝子変異検索の際にコレステロールを低下させる機能低下型 PCSK9 変異が検出されたことから、家系内症例も含めたより多数の症例で、PCSK9 遺伝子の機能亢進型変異 (E32K) と機能低下型変異 (R93C および W428X) が FH の臨床像に及ぼす影響についての検討を行った。

[IVA 法による LDLR 遺伝子変異検索]



日本人で報告のある LDLR 遺伝子変異 46 種類を IVA 法によりまとめて検索した。IVA 法では、まず変異の前後と相補的配列をもつ 2 種のプローブがゲノム DNA とハイブリダイズする。この際に変異部位上で形成される 3 重鎖構造を Cleavase が認識してシグナルプローブ上のフラップを切断、遊離したフラップは蛍光検出用の FRET プローブとハイブリダイズし、そこで再び形成される 3 重鎖構造を Cleavase が認識・切断することで蛍光物質が遊離する。この蛍光の増加量をリアルタイムで測定し、定量的な測定を行う。

[MLPA 法による LDLR 遺伝子の CNV 検索]



MLPA法の原理

LDLR 遺伝子の CNV 検索には、MRC-Holland 社の Salsa MLPA kit を用いた。MLPA 法では、標的遺伝子の 1 領域につき 2 つのプローブを用いる。各プローブセットはユニバーサルプライマーによる PCR 増幅のための共通配列およびサイズ調節塩基配列を持つ。標的遺伝子にハイブリダイズして隣接した 2 つのプローブがライゲースによって一本化されることにより、ユニバーサル蛍光標識プライマーでの PCR 増幅が可能となる。PCR 増幅フラグメントは、サイズ調節配列で標的領域ごとに長さを変えており、電気泳動解析で各領域のシグナルが分離される。これらシグナルのピーク値は標的遺伝子領域の存在量を反映するため、MLPA 法では複数の遺伝子欠失・増幅が部位特異的かつ定量的に検出可能となる。

本研究の遂行に際しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省・厚生労働省・経済産業省合同、平成 13 年)を遵守した。本研究は金沢大学倫理審査委員会の承認を得ており、その規定および審査、決定、助言に従った研究計画に基づき研究を適切に実施、個人情報保護を十分に行い、当該研究の内容について自由意志に基づくインフォームドコンセントを得た試料を用いた。

4. 研究成果

本研究では、当初予定していた 300 例を大幅に超える臨床診断 FH 518 例について遺伝子変異検索を行った。期待されたとおり、MLPA 法導入で新たに 8 種の CNV が検出され、LDLR 遺伝子の CNV 検出能はこれまでの 9% (3 種) から 13% (11 種) へと大幅に改善された。この結果より、本邦においても LDLR 遺伝子の CNV が比較的高頻度に存在し、MLPA 法が FH 病因遺伝子変異の同定に非常に極めて有用であることが判明した。また、IVA 法および MLPA 法にて変異が検出されなかった症例

を対象として LDLR 遺伝子の再精査を進めたところ、IVA による検出系に含まれていない点変異が新たに 10 種検出された。この結果は、対象とする変異以外は検出できない点変異検出系の手技的限界も示すとともに、FH という病態に LDLR 遺伝子が深く関与していることを改めて示すものであった。

一方、PCSK9 遺伝子については、E32K 変異が臨床診断 FH 症例の約 7% に存在し、遺伝性高脂血症との強い関連性が示された。日本人でこれまで変異が確認されていない apoB-100 遺伝子については、本研究でも変異が検出されなかった。

本課題により、これまで約 4 割存在した病因遺伝子変異未同定症例が、検索を行った症例の 27% にまで減少した。病因変異に基づいた治療、つまりテーラーメイド医療に結び付ける前段階として、変異の特定ならびにそれらの臨床像の把握は極めて重要であり、7 割以上という高検出率の変異検出系を確立しえたことは意義深い。

また、LDLR 遺伝子変異の確定した FH については、その臨床像を修飾する因子として、機能亢進型の PCSK9 E32K 変異、ならびに機能低下型の PCSK9 R93C と W428X 変異の有無を確認し、これらの PCSK9 遺伝子変異が FH の臨床像に及ぼす影響を調べた。この検討により、LDLR 遺伝子変異と機能亢進型 PCSK9 E32K 変異との合併例（ダブルヘテロ接合体）が 4 例見出された。これらのダブルヘテロ接合体症例は、未治療ではホモ接合体 FH の臨床像を呈するが、薬物療法に対して良好に反応することが明らかになった。これは、体外循環により LDL などのアポ B 含有リポ蛋白粒子を直接除去する LDL アフェレーシス療法が絶対適応とされる LDLR 遺伝子変異ホモ接合体とは大きく異なるものであった。学会や研究会における発表では、この治療効果の違いという点において非常に大きな反響が得られた。機能低下型 PCSK9 変異との合併例は 1 例のみで、詳細な検討は不可能だった。

FH の治療を考える上で、遺伝子変異の同定が治療法の選択に結びつく可能性を示すことが出来た点で、本研究は意義深いものであった。また、本研究を通じて特定の点変異のみを検索する手法の限界も確認されたことから、今後は High Resolution Melting 法のように遺伝子のエクソン単位で変異の有無を検出可能な手技の導入を考えており、既に予備検討を進めている。これらの新しい手法を導入してなお変異が同定されない症例には、新たな病因遺伝子による第 4 の FH とも言うべき貴重な症例が含まれていると考えられる。新たな病因遺伝子検索の基盤となる点でも、本課題は脂質代謝研究が次のステップへ進むために必要不可欠な研究であったと考える。

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 1 件)

1. Noguchi, T., Katsuda, S., Kawashiri, MA., Tada, H., Nohara, A., Inazu, A., Yamagishi, M., Kobayashi, J., Mabuchi, H., The E32K variant of PCSK9 exacerbates the phenotype of familial hypercholesterolaemia by increasing PCSK9 function and concentration in the circulation, *Atherosclerosis*, 210(2010), 166-172, 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. Noguchi, T., Common E32K mutation in the PCSK9 gene exacerbates the phenotype of familial hypercholesterolaemia despite moderate increase in plasma PCSK9 and LDL-C levels per se, PCSK9 Conference, 2010. 3. 11, Chambre de commerce et d'industrie de Nantes (France)

2. 野口徹, Effects of PCSK9 E32K and LDLR mutations on circulating PCSK9 levels, 第 41 回日本動脈硬化学会総会, 2009 年 7 月 17 日, 海峡メッセ下関 (山口県)

3. Noguchi, T., Profiles of gain-of-function PCSK9 E32K mutation: including pure homozygote and compound heterozygote with LDLR gene mutation, XV International Symposium on Atherosclerosis, 2009. 6. 16, John B. Hynes Convention Center (USA)

4. 野口徹, PCSK9 遺伝子 E32K 変異と家族性高コレステロール血症, 第 40 回日本動脈硬化学会総会, 2008 年 7 月 11 日, つくば国際会議場 (茨城県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 徹 (NOGUCHI TOHRU)
金沢大学・医学系研究科・特任助教
研究者番号: 40456421

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし