

弾性線維性仮性黄色腫症におけるアデノシン3リン酸結合カセットトランスポーターC6(ATP-binding cassette transporter C6,ABCC6)遺伝子の解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4548

弾性線維性仮性黄色腫症におけるアデノシン3リン酸結合カセット トランスポーターC6 (ATP-binding cassette transporter C6, ABCC6) 遺伝子の解析

金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管分子遺伝学
(旧講座名：内科学第二)
(主任：馬淵 宏教授)

野 路 善 博

弾性線維性仮性黄色腫症 (Pseudoxanthoma elasticum, PXE) は皮膚病変、眼底病変ならびに、冠動脈、下肢大動脈の病変、消化管出血などの全身の血管病変と弾性線維の石灰化を特徴とする常染色体劣性遺伝性疾患であり、頻度は7万人～100万人に1人と報告されている。その原因遺伝子は2000年にATP-binding cassette transporter C6 (ABCC6 or MRP6) 遺伝子であると同定された。現在までに白人PXE患者においてはABCC6遺伝子の解析が進んでいるが、日本人については解析の報告はない。今回、日本人PXE患者とその家族につきABCC6遺伝子の解析を行い検討した。皮膚生検により確定診断のなされた日本人PXE患者6名とその家族を対象とした。PCR一本鎖構成体多型法 (PCR-single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP)、自動化直接塩基配列決定法 (direct sequencing) によりABCC6遺伝子の変異を検出した。明らかとなった遺伝子変異については、変異アリル特異的制限酵素切断 (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) による確認を行った。症例1はエクソン26の1221番目のアミノ酸であるアルギニンをコードするコドンCGCがシステインをコードするコドンTGCへと変化するヘテロ変異R1221Cとエクソン29の1357番目のアミノ酸であるアルギニンをコードするコドンCGGがトリプトファンをコードするコドンTGGへと変化したヘテロ変異R1357Wの複合型ヘテロ接合体であると考えられた。R1221CとR1357Wは報告が無く、新しい変異と考えられた。症例2ではエクソン19に2542番目の塩基であるグアニンの1塩基欠失(2542delG)ヘテロ接合性変異を認めた。またエクソン9に378番目のアミノ酸であるグルタミンをコードするコドンCAGがストップコドンTAGへと変化するヘテロ変異Q378Xが検出された。症例3は2542番目の塩基であるグアニンの1塩基欠失(2542delG)ホモ接合体であった。また低比重リポ蛋白受容体 (low density lipoprotein receptor, LDL-R) に6kb欠失のFH Tonami-1ヘテロ接合体を検出した。症例4、症例5はQ378Xホモ接合体であり、症例6はQ378Xヘテロ接合体であった。Q378X変異には偽遺伝子からの遺伝子変換の関与が考えられヘテロ接合体の場合にはQ378Xが偽遺伝子に存在するかABCC6遺伝子に存在するかを更に確認する必要があると考えられた。日本人(北陸地方)の弾性線維性仮性黄色腫症患者では、Q378X, 2542delG変異の頻度が高い可能性が示唆された。白人の弾性線維性仮性黄色腫症患者で頻度の高いとされるR1141X, ABCC6del23-29等は検出されず人種による遺伝子異常の様式の違いが考えられた。遺伝子型と表現型の関連については明らかなのは見出されなかった。

Key words pseudoxanthoma elasticum, ATP-binding cassette transporter protein, ABCC6, pseudogene

弾性線維性仮性黄色腫症 (Pseudoxanthoma elasticum, PXE) は皮膚病変、眼底病変ならびに、冠動脈、下肢大動脈の病変、消化管出血などの全身の血管病変と弾性線維の石灰化を特徴とする遺伝性疾患である^{1)~3)}。ほとんどの家系での遺伝形式は常染色体劣性遺伝であるが、常染色体優性遺伝を示す家系の報告もある⁴⁾⁵⁾。PXEの頻度は7万人に1人から100万人に1人と報告により差が見られる³⁾⁶⁾が、16万人に1人程度が最も一般的である²⁾。

皮膚病変は最も多く見られるが、本疾患において早期から出

現する症状でもある。異常な石灰化を伴った弾性線維の集簇により典型的な黄色皮膚疹が形成される。皮膚病変は頸部、腋窩部、肘窩部、鼠径部、臍周囲部に認められる¹⁾³⁾⁷⁾。PXEの組織診断は病変部の皮膚生検により石灰化した弾性線維の集簇をVerhoeff-van Gieson染色、Elastica van Gieson染色あるいはKossa染色により証明することによってなされる。

皮膚病変に続き、眼底病変が出現するとされる。網膜色素線条 (angioid streaks) と呼ばれる特徴的な所見はBruch膜の破綻によって引き起こされる。病変の進行に伴い、眼底出血、血管

平成13年11月27日受付, 平成13年12月28日受理

Abbreviations : ABC, ATP-binding cassette; ABCC6, ATP-binding cassette transporter C6; DIG, digoxigenin; FH, familial hypercholesterolemia; LDL, low density lipoprotein; LDL-R, low density lipoprotein receptor; PCR-DGGE,

新生が起こり最終的には高度の視力障害に至る⁸⁹⁾。

最後に内膜弾性板への石灰化により心血管病変の症状が出現する。それは、高血圧、間欠性跛行、末梢血管脈拍の触知不良、また胃粘膜の血管からの出血を含む。早発性動脈硬化症は狭心症、心筋梗塞を引き起こす²¹⁰⁾。

PXEはRigal¹¹⁾により1881年に初めて報告されたが、1896年にDarier¹²⁾がエラスチンの組織学的異常を見出し、“pseudoxanthoma elasticum”と名付けるまでは遺伝性疾患とは認識されていなかった。その後PXE原因遺伝子を探る多くの研究が行われたにもかかわらず最近になるまで特定できなかった。PXEの病理組織異常が弾性線維に存在することから、原因遺伝子として弾性線維の産生や組成に関わる遺伝子が最初に候補に挙がった¹³⁾。その中には第7染色体のエラスチン遺伝子、第15染色体のフィブリリン1、第5染色体のフィブリリン2などが含まれていたが、連鎖解析により否定された。

1997年になりPXE遺伝子が第16染色体の短腕に存在することがポジショナル・クローニングにより明らかになった¹⁴⁾¹⁵⁾。その後この遺伝子座は候補遺伝子を含む500kbの領域に絞られた¹⁶⁾¹⁷⁾。

最終的にアデノシン3リン酸結合カセットトランスポーターC6 (ATP-binding cassette transporter C6, ABCC6) 遺伝子が原因であることが2000年に相次いで報告された^{18)~22)}。ABCC6遺伝子には31のエクソンが存在し、その大きさは75kbにおよぶ(図1)。また165-kDの膜蛋白を産生する。ABCC6のメッセンジャーRNAは肝臓と腎臓に優位に発現している²³⁾。しかしながら、ABCC6の機能については未解明の点が多い。

ABC蛋白は、ATP結合ドメイン領域を1機能分子内に2つもち、12から17回膜貫通領域を持つ膜蛋白ファミリーである。ATP binding cassetteの頭文字をとってABC蛋白と呼ばれる。ABC蛋白はATPのエネルギーに依存して様々な物質を膜の内外へ能動輸送するトランスポーターと考えられている²⁴⁾。生体には薬などの異物を排出して生体を防御する機構が備わっている。この機構が障害されると様々な疾患が発生し、過剰に働くガン細胞は抗ガン剤に耐性となる。最近、この機構のいくつか

が解明された結果、いずれもABC蛋白が原因であった。ヒトのABC蛋白遺伝子は52種類が同定されており、抗ガン剤耐性や遺伝病などの疾病に関与することが次々に明らかにされている^{25)~27)}。ABCCファミリーは一般に脂溶性生体異物を排出するトランスポーターであり、血液脳関門など生体防御機構として働く。

ABCC6の機能について詳細は現在不明であるが、ABCC1と相同性が高いことから機能も類似していると考えられている。ABCC1は疎水性物質の輸送や抗ガン剤多剤耐性に関与していることが判明しているため²⁷⁾、ABCC6も細胞からの異物排泄に関わっていると予想される²⁸⁾。しかしながら、その後Madonら²⁹⁾によってABCC6の基質特異性はABCC1のものとは違っていることが示され、陰性荷電ペプチドであるBQ123が唯一ABCC6に基質特異性の高い物質と認識されているがABCC6の機能までは説明できていない。

現在までに欧米人(主に白人)PXE患者において、ABCC6遺伝子の異常が検討されてきており^{18)~22)30)31)}、人種による遺伝子異常の様式に差が認められている³²⁾。しかしながら、日本人PXE患者においてABCC6遺伝子異常を検討した報告は現在のところない。

本研究では日本人PXE患者とその家族においてABCC6遺伝子異常につき検討した。

対象および方法

I. 対 象

皮膚生検により確定診断のなされた日本人PXE患者6名とその家族を対象とした。それぞれの家系の特徴を以下に示す。

家系1では、発端者(症例1)は23歳女性。両親に血族婚なし。小学生の頃から頸部の淡黄色皮疹(図2-A)あり。息切れ自覚あり受診。頸部皮膚生検にてPXEと診断(図2-B)。冠動脈造影にて右冠動脈90%、左回旋枝に95%狭窄あり(図2-D)。血液検査では総コレステロール180mg/dl、トリグリセリド55mg/dl、HDL-C 59mg/dlであった。他の冠危険因子として喫煙を認めた(15本/日)が、家族歴ならびに高血圧、糖尿病の合併は認めな

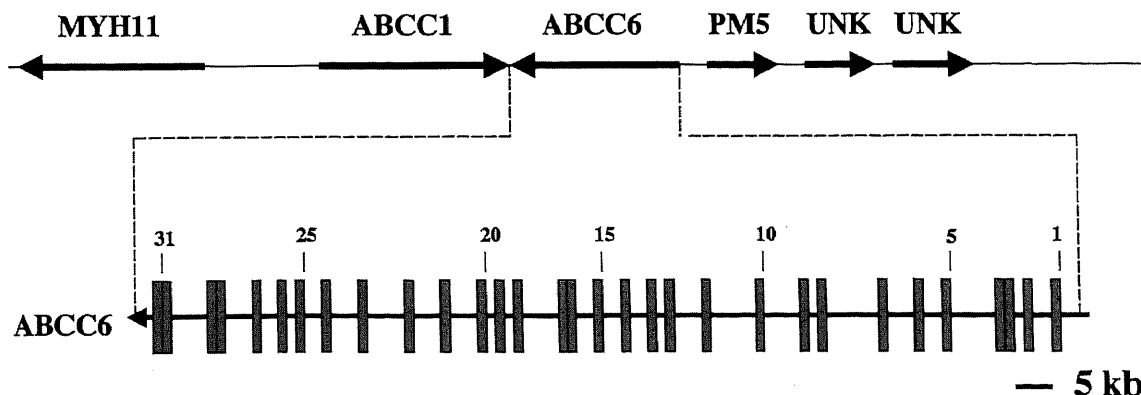


Fig. 1. Genomic organization of *ABCC6*. Intron-exon organization of the gene is shown. *ABCC6* contains 31 exons, spans a 75-kb genomic region on 16p 13.1., and is predicted to encode a protein of 1503 amino acids. The exons (vertical bars) and introns (horizontal lines) are drawn to scale. The gene content of the PXE locus is represented from the telomere (left) to the centromere (right). The transcriptional orientation of the gene is indicated by arrows. The exons are numbered from the 5' end of *ABCC6*.

PCR-denaturing gradient gel electrophoresis; PCR-RFLP, PCR-restriction fragment length polymorphism; PCR-SSCP, PCR-single strand conformational polymorphism; PXE, pseudoxanthoma elasticum; TBE, Tris-borate EDTA buffer

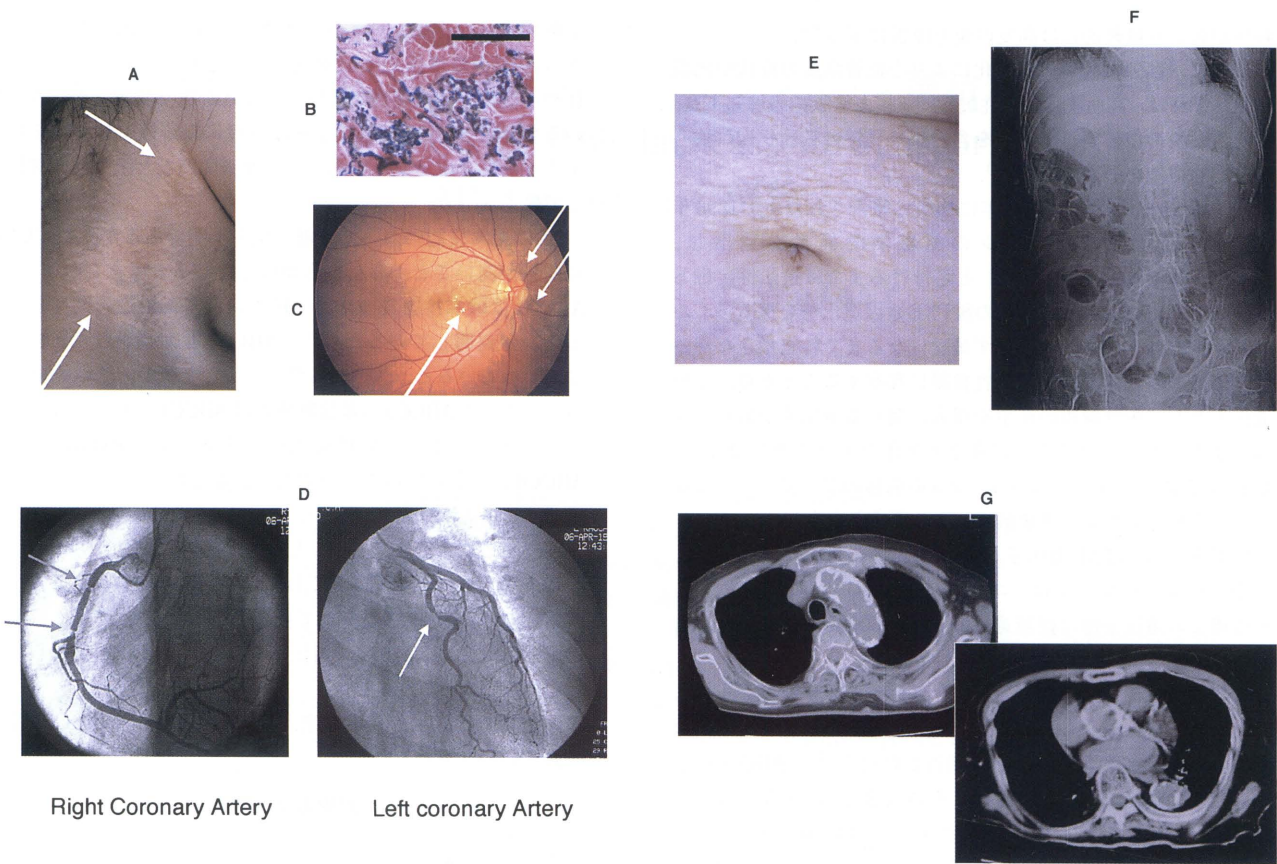


Fig. 2. Phenotypic characteristics of PXE. (A) Typical yellowish papules on the right neck of the case 1. (B) Skin biopsy from this area revealed typical fragmentation and clumping of elastic tissue by Elastica van Gieson stain. Scale bar indicates 70 μ m. (C) Ophthalmologic findings of the case 2. Macula bleeding and angiod streaks were found. (D) Cardiac catheterization revealed that she (case 1) had severe coronary stenosis in both coronary arteries. (E) Yellow coloured skin eruptions were observed in neck, axilla, umbilical and inguinal resion (case 3). (F) Remarkable calcification was apparent from ascending aorta to femoral arteries (case 3). (G) Severe calcification was revealed by computed tomography in coronary arteries as well as aorta (case 3).

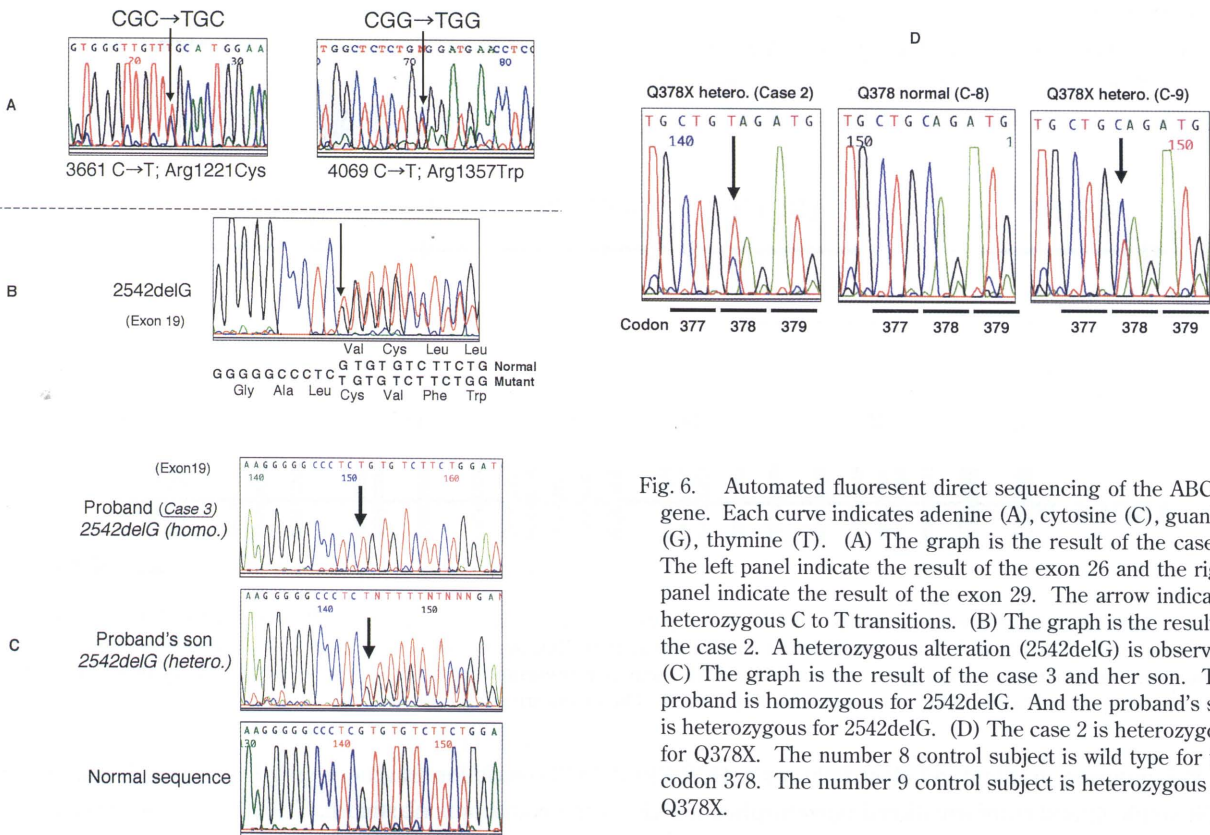


Fig. 6. Automated fluorescent direct sequencing of the ABCC6 gene. Each curve indicates adenine (A), cytosine (C), guanine (G), thymine (T). (A) The graph is the result of the case 1. The left panel indicate the result of the exon 26 and the right panel indicate the result of the exon 29. The arrow indicates heterozygous C to T transitions. (B) The graph is the result of the case 2. A heterozygous alteration (2542delG) is observed. (C) The graph is the result of the case 3 and her son. The proband is homozygous for 2542delG. And the proband's son is heterozygous for 2542delG. (D) The case 2 is heterozygous for Q378X. The number 8 control subject is wild type for the codon 378. The number 9 control subject is heterozygous for Q378X.

かった。

家系2発端者(症例2)は48歳男性。胃潰瘍の既往あり。両親に血族婚あり。黄斑出血と網膜色素線条あり(図2-C)。祖母が40歳時に失明し、父親にも眼症状あり。明らかな皮疹ないが、腋窩皮膚生検にてPXEと診断された。

家系3発端者(症例3)は75歳女性。家族性高コレステロール血症(Familial hypercholesterolemia, FH)の合併例。既往に脳出血。両親に血族婚なし。頸部、腹部(図2-E)、鼠径部に黄色丘疹あり。腹部皮膚生検にてPXEと診断。痴呆あり(長谷川式

痴呆スケール7点)。冠状動脈ならびに、大動脈全長にわたる高度石灰化の画像所見を認めた(図2-F, G)。

家系4発端者(症例4)は65歳女性。既往に高血圧、眼底出血あり。両親に血族婚なし。頸胸腹部、腋窩に黄色丘疹あり。59歳時に多発性脳梗塞と診断され、60歳時に未破裂脳動脈瘤の手術を受けた。腋窩皮膚生検にてPXEと診断された。

家系5発端者(症例5)は46歳男性。既往に高血圧、両親に血族婚あり。頸胸腹部、腋窩に黄色丘疹あり。44歳時に多発性脳梗塞と診断されている。胸部皮膚生検にてPXEと診断された。

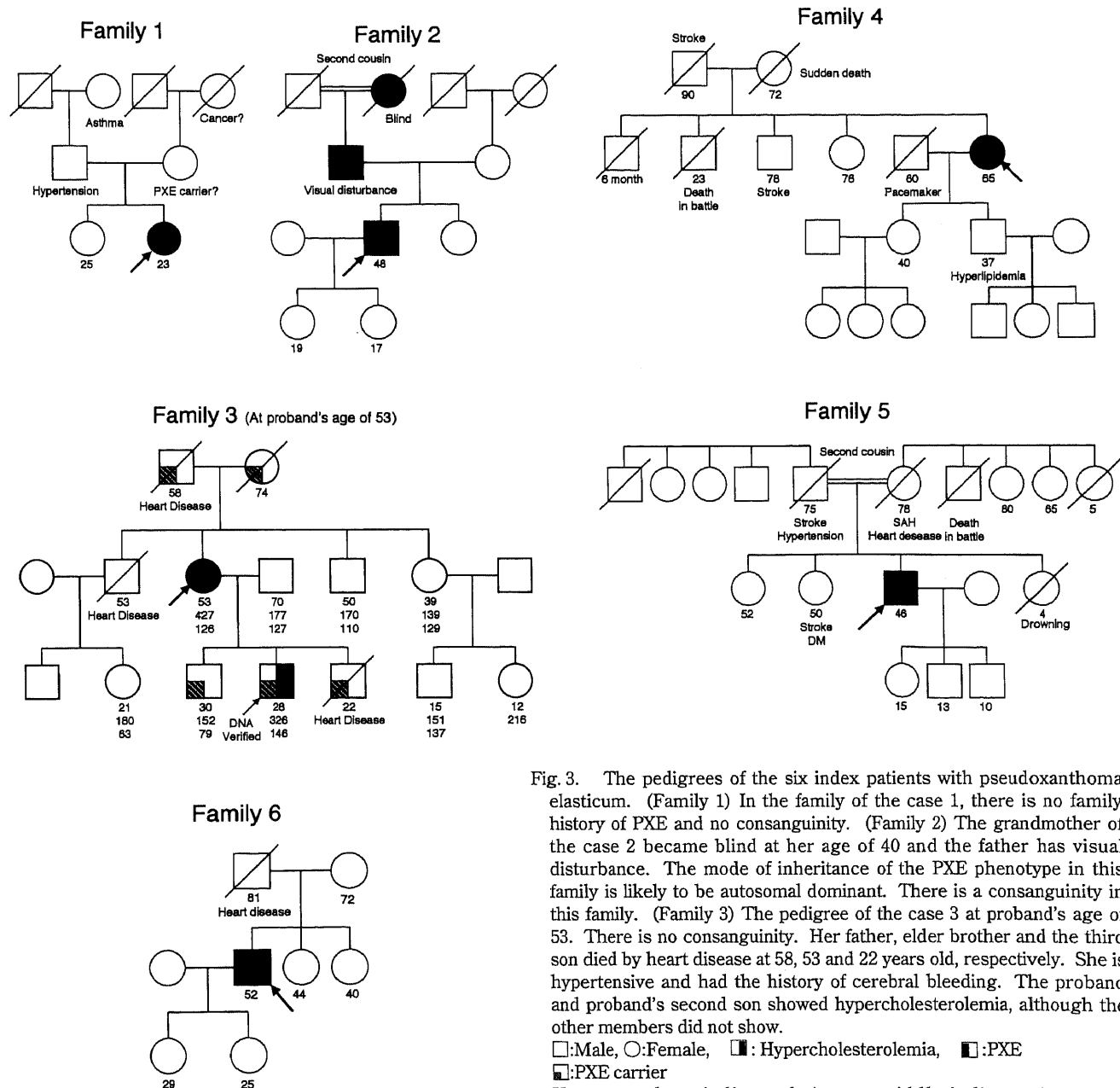


Fig. 3. The pedigrees of the six index patients with pseudoxanthoma elasticum. (Family 1) In the family of the case 1, there is no family history of PXE and no consanguinity. (Family 2) The grandmother of the case 2 became blind at her age of 40 and the father has visual disturbance. The mode of inheritance of the PXE phenotype in this family is likely to be autosomal dominant. There is a consanguinity in this family. (Family 3) The pedigree of the case 3 at proband's age of 53. There is no consanguinity. Her father, elder brother and the third son died by heart disease at 58, 53 and 22 years old, respectively. She is hypertensive and had the history of cerebral bleeding. The proband and proband's second son showed hypercholesterolemia, although the other members did not show.

□: Male, ○: Female, ■: Hypercholesterolemia, ▨: PXE, ▩: PXE carrier

Upper numbers indicate their age, middle indicate their total cholesterol levels, lower indicate their triglyceride levels.

(Family 4) There is a family history of cerebrovascular events. There is no family history of PXE and no consanguinity. (Family 5) Both of the proband's parents died by cerebrovascular events. There is no family history of PXE. There is a consanguinity in this family. SAH, subarachnoid hemorrhage; DM, diabetes mellitus. (Family 6). There is no family history of PXE and no consanguinity.

家系6発端者(症例6)は52歳女性。既往に高血圧、胃潰瘍あり。飛蚊症あり眼科受診し、網膜色素線条を指摘された。PXE疑われ皮膚科受診し、腋窩皮膚生検にてPXEと診断された。

いずれの家系においても、発端者以外に明らかな皮膚病変を有する家族は認めなかった。それぞれの家系図を図3に示す。

検体採取は、患者本人ならびにその家族に説明と文書による同意取得の後に行われた。正常対照として100人の検診受診者の検体を使用した。

本研究は金沢大学大学院医学系研究科等ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認を得た(許可年月日:平成13年12月3日, 許可番号:第11号, 課題名:弾性線維性仮性黄色腫患者におけるABCC6(MRP6)遺伝子の解析)。

II. 方法

1. 高分子DNA抽出

対象者の末梢静脈血10mlをEDTA-2Naを抗凝固剤として採取し4℃にて移送, -20℃にて保存した。この末梢血を室温にて解凍後トライトンX-100融解変法³³⁾にて高分子DNAを単離した。すなわち融解液(320mMショ糖液, 1%トライトンX-100, 5mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl, pH 7.6)にて赤血球を溶血させ、遠心により沈澱として白血球を集めた。これをプロテアーゼK

(Sigma, St. Louis, USA)にて消化後、フェノール-クロロホルム(1:1)で1回, 続いてクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)にて2回抽出し, 最後にエタノール沈澱によりDNAを分離した。こうして得られたDNAをTris-EDTA緩衝液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA-2Na, pH 8.0)に溶解の上260nmにおける吸光度測定により濃度を求めた。

2. PCR

ABCC6遺伝子の全ての31エクソンを増幅するためのプライマーをそれぞれのエクソン領域の前後のイントロン領域に設定した(図1, 表1)。プライマー設定にはPrimer3(<http://waldo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3>)を使用した。ABCC6遺伝子のゲノムDNAの塩基配列はGenBank accession No. U91318を引用した。ABCC6のcDNAの塩基配列(GenBank accession No. NM_001171)とゲノムDNAの塩基配列を比較することによりイントロンとエクソンの境界を決定した。プライマーの合成は日本製粉(株)カスタムサービス(厚木, 神奈川)に委託した。合成されるDNA断片はそれぞれ142bpから368bpの大きさになると考えられた。エクソン31については前後半(α および β)に2分割してプライマーを設定した。(表1)。

DNA断片の増幅にはSaikiら³⁴⁾によるPCR法を用いた。高分

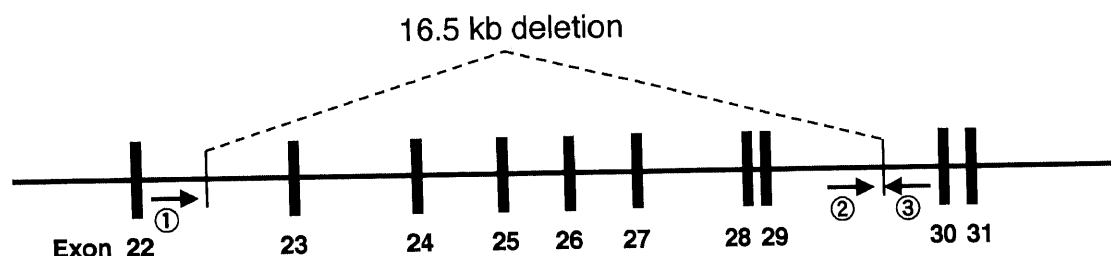


Fig. 4. Schematic representation of the common deletion mutation in US families and the locations of primers for the detection. The 16.5 kb deletion mutation extends from intron 22 to intron 29. The positions of the three primers used for PCR detection of the deletion mutation are indicated (circled numbers; ①DEL-1, ②DEL-2, ③DEL-3). (From Ringpfeiffer et al.³¹⁾ with modification)

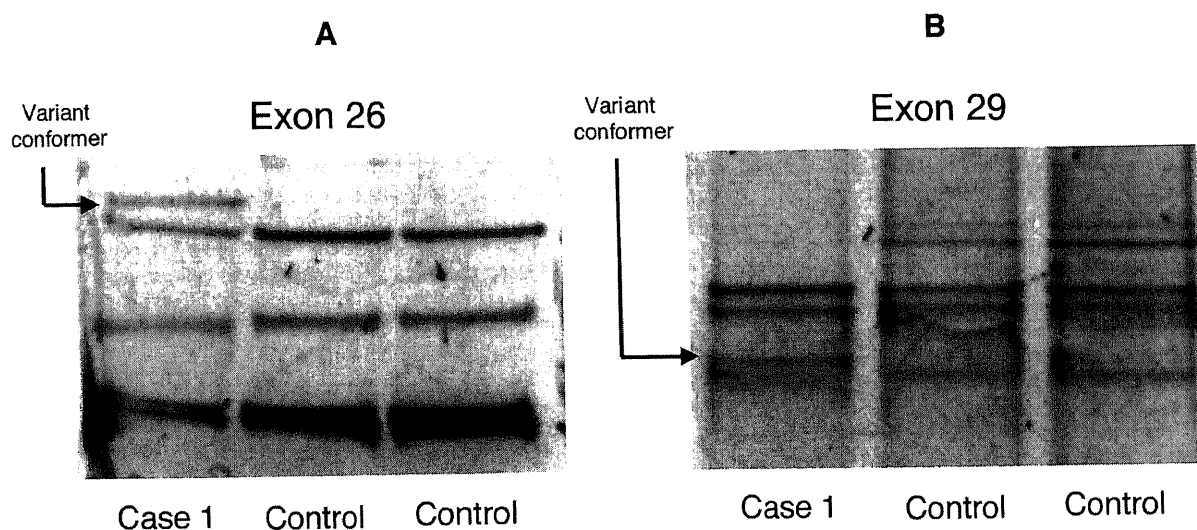


Fig. 5. PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis in the exons 26 and 29 of ATP-binding cassette transporter C (ABCC6) gene. In both panels of (A) and (B), the bars along the left side indicate the case 1. Other bars are control subjects. The patient showed the mutational pattern with variant conformer both in exons 26 and 29.

子DNA 1 μ g を鋳型DNAとして10pmolのプライマー1セットと終濃度200 μ Mとなる量の各デオキシヌクレオチド(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)と2.5単位のTaqポリメラーゼ (Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, USA) を, 0.01%ゼラチンを含む緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂) に加え再滅菌蒸留水を反応液が50 μ lとなるように加え攪拌した。速心して反応液を集め50 μ lのミネラルオイル (Sigma) を滴下して蒸発を防ぎ, 95℃×5分の初期変性の後, 95℃×60秒, 60℃×60秒, 72℃×90秒を基本にそれぞれのセット毎に決定した温度条件のもと35サイクルの反応を行った。

増幅したDNA断片は, 2%アガロースゲルに鎖長マーカー ϕ -X174/*Hae*III消化物 (東洋紡, 東京) と共に泳動しエチジウム

ブロマイド染色後, 紫外線照射装置にて観察し断片長を確認した。

3. PCR一本鎖構成体多型法 (PCR-single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP) による変異の検出

泳動用緩衝液としてTris-HCl 54 g, ホウ酸27.5 g, 0.5 M EDTA 20 mlに蒸留水を加え3 Lにしたものを保存用の5×Tris-ホウ酸-EDTA (Tris-boric acid-EDTA, TBE) 泳動用緩衝液とし泳動直前に1×の濃度に希釈した。

0.5 mM EDTA 2 μ l, 5 N NaOH 10 μ l, 滅菌再蒸留水88 μ lを混合したアルカリ溶液を作り, PCR産物8 μ lにアルカリ溶液2 μ lを加え42℃3分, 95℃2分加熱後, 0℃に急冷し一本鎖に変性させた。そのうえで, 10%ポリアクリルアミドゲル (アトー,

Table 1. Oligonucleotide sequence

Primer	Name	Sequence	Product size (bp)
Exon1	E1F	5'-GAATTTGGGGGTCTCTCCTC-3'	191
	E1R	5'-GCCCAGAGACTTAGCGACAG-3'	
Exon2	E2F	5'-CGAACATTGCCTGGTTCC-3'	268
	E2R	5'-CCCTGCCTTGTAACCATCCTA-3'	
Exon3	E3F	5'-CTCCAGACTGAAGGCATCAT-3'	207
	E3R	5'-CCAGTTTGCTGTGACCTCTCT-3'	
Exon4	E4F	5'-ATGAGCCACCATTTTGGTTT-3'	206
	E4R	5'-CTAAGGGGCCCTCCCTGACT-3'	
Exon5	E5F	5'-GGAACAGGAATGAGGTTGGA-3'	212
	E5R	5'-CTGAGCACCTCCTCTGTCT-3'	
Exon6	E6F	5'-GGGAATCAGAGCAGCAAATG-3'	180
	E6R	5'-GTCTTCTCAACCTTGCCACA-3'	
Exon7	E7F	5'-TTCCTGACCTCCACCACTT-3'	241
	E7R	5'-ACCCAGGGTCACACAGCTAC-3'	
Exon8	E8F	5'-GAGACCACCCACCTTAGCAG-3'	303
	E8R	5'-GCTGGCGGCTGAGAGTATAA-3'	
Exon9	E9F	5'-CCCGCTCAGTGATACTGCTT-3'	271
	E9R	5'-CAGCTGTACCTTCTCCCTCCT-3'	
Exon10	E10F	5'-ACTCCGTTCAAATCCCGTCT-3'	239
	E10R	5'-GGCCTCCCCACTTTACTTCT-3'	
Exon11	E11F	5'-GTGGCTTCCTCCCTACTTCC-3'	200
	E11R	5'-CTCTGAGAGCTGGGCTCCT-3'	
Exon12	E12F	5'-CAGTGCTGCTCAGCATAGAGA-3'	306
	E12R	5'-GTCAGGGTGCAGGGAAGAAT-3'	
Exon13	E13F	5'-GAAGCTGGAGCCAGGTGTAG-3'	263
	E13R	5'-TATCCATGCTTGCGTGTCTC-3'	
Exon14	E14F	5'-CAGTACTGATGCTGGCTTGC-3'	217
	E14R	5'-CTCTTCTTGCTGGGTGACCT-3'	
Exon15	E15F	5'-GGCTGGTTACTACGGGTGTC-3'	142
	E15R	5'-CAGGGGTCTCCTGTAAATGG-3'	
Exon16	E16F	5'-GATGGGGACATCCTAGCAGA-3'	198
	E16R	5'-CAAGGTCATGTCTCCCTCT-3'	
Exon17	E17F	5'-TGTCTCCCTGTCCCAAAAAG-3'	250
	E17R	5'-CATCATCTCCTGTGACCAA-3'	
Exon18	E18F	5'-AAGTGCTTCCTCTGCCTTTG-3'	250
	E18R	5'-CAGGCCACTGTTCTCTTTTGT-3'	
Exon19	E19F	5'-GAATCAGCAAAGCCCACCTA-3'	269
	E19R	5'-TGTTGGGATTACAGGCATGA-3'	
Exon20	E20F	5'-AGCCTGTGCCCTTCTGAGT-3'	200
	E20R	5'-AGAGCGGTAAAGGCCACATA-3'	
Exon21	E21F	5'-ACATTTGGTGGGAGGACTTG-3'	246
	E21R	5'-CCCACCATTTGGGAGAGATAC-3'	
Exon22	E22F	5'-GATGAGGAGGGCAGGTGAG-3'	256
	E22R	5'-CCTCTCCCTCATGTGTGCTA-3'	
Exon23	E23F	5'-CCTCCCTGACCTCTCCGTA-3'	368
	E23R	5'-TCCAGCCCTCATGCTCTTAC-3'	
Exon24	E24F	5'-CTGCCCTGGCTCTTCTCTAC-3'	251
	E24R	5'-CTCCTCTTCCCTCTCCCATC-3'	
Exon25	E25F	5'-CCTCTGTCTGTCCCTCAAGC-3'	205
	E25R	5'-TAACCACTCACCTGTGTGTC-3'	
Exon26	E26F	5'-GATGTCAACAGGGACCCATT-3'	200
	E26R	5'-CCAGAGAGGCITTCTTGAC-3'	
Exon27	E27F	5'-GTCCTTTGGCCTAAACTCCA-3'	221
	E27R	5'-ACTCAGTTTCCCCTCCTGCT-3'	
Exon28	E28F	5'-ACCATGCCTCCCATCTTTG-3'	260
	E28R	5'-CCAATAAATGCCCAAAACC-3'	
Exon29	E29F	5'-ATTTCTGAAGGCCCTTGG-3'	303
	E29R	5'-AAAGATGGGAGGCATGGTG-3'	
Exon30	E30F	5'-GGCTGCTGTGAGGTCAGG-3'	258
	E30R	5'-CCAGCTAATTGTCCCAATCG-3'	
Exon31 α *	E31F α	5'-TGGGGTACCAAGTACACGAA-3'	360
	E31R α	5'-AGACCTGTGTTTGCTCTCTGG-3'	
Exon31 β *	E31F β	5'-GCCACTTTCTCTGCCATTTT-3'	286
	E31R β	5'-GCCTCTCTGTCTCCCTCTCC-3'	
ABCC6del23-29			
DEL-1	5'-GGAATACTCAAGGCGAATGG-3'		652
	5'-TCTTGAAGCAGCAGTGAGTC-3'		552
	5'-TTGAGCAGGCTGACTGTAGG-3'		
*Exon31 α primer set can amplify the first half of exon 31.			

*Exon31 α primer set can amplify the first half of exon 31, and Exon31 β primer set can amplify the latter half.

Table 2. Methods for reastriiction fragment length polymorphism

Variant	Primer Name	Primer Oligonucleotide *1 Sequence	Annealing Temperature (°C)	Restriction Enzymes	Product size (bp)*2
1132C→T (Q378X)	E9M1	5'-CCGGTCACTACCGGCTGGCGTTGGAGTAcA-3'	62	<i>Rsa</i> I	121, 48 121, 30, 18
	E9M2	5'-GCAAGCCTTTCTCTGGAGTT-3'			
	E9F	5'-CCCGCTCAGTGATACTGCTT-3'	60	<i>Pst</i> I	163, 108 271
	E9R	5'-CAGCTGTACCTTCTCCCTCCT-3'			
3661C→T (R1221C)	E26F	5'-GATGTCAACAGGGACCCATT-3'	62	<i>Tsp</i> EI	180 149, 31
	E26M1	5'-CAGGTGACCCAGACACTGCAGTGGGTaaT-3'			
	E26M2	5'-GCTACGACAAGAGATCCAGACAGGTCAaa-3'	60	<i>Taq</i> I	168, 25 193
	E26M3	5'-TCCTCAGACTGTCCCATTCC-3'			
4069C→T (R1357W)	E29F	5'-ATTTCTGAAGGCCCTTGG-3'	58	<i>Mae</i> II	251 222, 29
	E29M1	5'-AGGACCCCATCCTGTTCCCTGGCTCTacG-3'			
	E29F	5'-ATTTCTGAAGGCCCTTGG-3'	60	<i>Acc</i> II	222, 30 252
	E29M2	5'-CCCCATCCTGTTCCCTGGCTCTcc-3'			

*1 Small letter indicates mismatch in oligo to create restriction site. Upper: forward primers, Lower: reverse primers.

*2 Upper: wild-type allele, Lower: variant allele.

東京)を用いてTBE緩衝液中で4℃のもと40 V、12-16時間泳動した。

染色にはSYBR Gold nucleic acid gel stain (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Netherlands)を用い、プロトコールに従って染色を行った。すなわち、SYBR Gold nucleic acid gel stain原液をTBE緩衝液によって10000倍に希釈した中に泳動の終了した10%ポリアクリルアミドゲルを浸し、30分間振盪させた。その後、紫外線照射装置にて観察し断片長を確認した。

4. 自動化直接塩基配列決定法 (direct sequencing) による塩基配列の確認

表1で示したプライマーを用いて反応を行ったPCR産物を2%の通常のアガロースゲルに鎖長マーカーとしてΦ-X174/*Hae*III消化物と共に泳動し、断片長を確認した上で、目的とするDNA断片のバンドを含む部分を切り出した。−80℃で凍結させた後に室温で解凍した。Ultrafree-DA (Amicon)にてこのDNA断片を10,000 rpmで15分間遠心した。遠心されたDNA断片をマイクロコン (Amicon)に移し換えた後に再度10,000 rpmで15分間遠心した。再滅菌蒸留水20 μlを加えて再度遠心し、濃縮すると同時に余分なプライマー、およびヌクレオチドを除去し鋳型DNAとした。これにダイ・ターミネーター・サイクルシークエンス・キット (Amersham)を用いサイクルシークエンス法を行った。

自動化直接塩基配列決定法としてABI PRISM TM310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer)を用いた。これは、キャピラリー型の塩基配列解析装置で、読み取られたデータはパーソナルコンピューターPower Macintosh G3 (Apple Computer, Cupertino, USA) 本体内蔵の固定ディスクに数値データとして保存された。反応終了後に塩基配列解析を自動的に行い、配列を文字データおよび波形のグラフとして出力した。

5. 変異アリル特異的制限酵素切断 (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)

変異配列が決定された後、変異の存在の確認およびスクリーニングのため特定の制限酵素で切断部位が生ずるようにミスマッチプライマーを設定した³⁵⁾。すなわち、このミスマッチ塩基

と変異塩基を含む4塩基で特定の制限酵素部位が生ずるようにした。一側に通常のプライマーを、反対側に変異プライマーを用い、温度条件を再度調節したうえでPCR法により強制的に変異配列を導入したDNA断片を増幅した。その上でピベットにてミネラルオイルの下層よりPCR産物を取り出し、切断部位に応じた制限酵素とその反応用緩衝液を加え酵素の至適温度条件下にて6~12時間反応させた。それぞれの変異確定に実際に用いたPCR-RFLP法を示す(表2)。

1) 1132CのTへの変異 (Q378X)

変異が存在する場合切断されるように以下のように行った。センスプライマーとしてE9M1、アンチセンスプライマーとしてE9M2(表2)を用いた。得られたPCR産物を、塩基配列5'-GTAC-3'を特異的に切断する制限酵素*Rsa* I (和光, 東京)により至適温度37℃で6時間反応させた。PCR産物は169bpの鎖長であるが、制限酵素*Rsa* Iによる反応後、変異を持つアリルは121bpと30bpと18bpのサイズに2ヶ所で切断される。一方、正常アリルは1ヶ所のみで切断され121bpと48bpの鎖長になる。

また、変異が存在する場合切断されず、正常アリルが切断されるよう以下のように行った。センスプライマーとしてE9F、アンチセンスプライマーとしてE9R(表2)を用いた。得られたPCR産物を、塩基配列5'-CTGCAG-3'を特異的に切断する制限酵素*Pst* I (和光, 東京)により至適温度37℃で12時間反応させた。PCR産物は271bpの鎖長であるが、制限酵素*Pst* Iによる反応後、変異を持つアリルは切断されず、正常のアリルは108bpと163bpの鎖長に切断される。

2) 3661CのTへの変異 (R1221C)

変異が存在する場合切断されるように以下のように行った。センスプライマーとしてE26F、アンチセンスプライマーとしてE26M1(表2)を用いた。得られたPCR産物を、塩基配列5'-AATT-3'を特異的に切断する制限酵素*Tsp* EI (東洋紡, 東京)により至適温度65℃で6時間反応させた。PCR産物は180bpの鎖長であるが、制限酵素*Tsp* EIによる反応後、変異を持つアリルは149bpと31bpの鎖長に切断される。

また、変異が存在する場合切断されず、正常アリルが切断さ

Table 3. Genotype-phenotype correlation

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6
Age and sex	23 female	48 male	75 female	65 female	46 male	52 female
Mutations in ABCC6 gene	R1221C, R1357W	2542delG, Q378X?	2542delG (homo.)	Q378X (homo.)	Q378X (homo.)	Q378X?
Skin findings						
Yellowish papules	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Eye findings						
Angioid streaks	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes
Retinal hemorrhage	No	Yes	No	Yes	No	No
Loss of visual acuity	No	Yes	No	Yes	No	No
Cardiovascular findings						
Hypertension	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Intermittent claudication	No	No	No	No	No	No
Gastrointestinal bleeding	No	Yes	No	No	No	Yes
Ischemic heart disease	Yes	No	Yes	Yes	No	No
Stroke	No	No	Yes	Yes	Yes	No
Vascular calcification	No	No	Severe	No	Yes	Yes

れるよう以下のように行った。センスプライマーとしてE26M2, アンチセンスプライマーとしてE26M3 (表2) を用いた。得られたPCR産物を、塩基配列5'-TCGA-3'を特異的に切断する制限酵素 *Taq* I (東洋紡, 東京) により至適温度65℃で6時間反応させた。PCR産物は193bpの鎖長であるが、制限酵素 *Taq* I による反応後、変異を持つアリルは切断されず、正常のアリルは168bpと25bpの鎖長に切断される。

3) 4069CのTへの変異 (R1357W)

センスプライマーとしてE29F, アンチセンスプライマーとしてE29M1 (表2) を用いた。得られたPCR産物を、塩基配列5'-ACGT-3'を特異的に切断する制限酵素 *Mae* II (Boehringer mannheim, Germany) により至適温度37℃で6時間反応させた。PCR産物は251bpの鎖長であるが、制限酵素 *Mae* II による反応後、変異を持つアリルは222bpと29bpの鎖長に切断される。

また、変異が存在する場合切断されず、正常アリルが切断されるよう以下のように行った。センスプライマーとしてE29F, アンチセンスプライマーとしてE29M2 (表2) を用いた。得られたPCR産物を、塩基配列5'-CGCG-3'を特異的に切断する制限酵素 *Acc* II (和光, 東京) により至適温度65℃で6時間反応させた。PCR産物は252bpの鎖長であるが、制限酵素 *Acc* II による反応後、変異を持つアリルは切断されず、正常のアリルは222bpと30bpの鎖長に切断される。

6. “ABCC6del23-29” 欠失の有無の解析

ABCC6遺伝子のイントロン22からイントロン29におよぶ(エクソン23から29を含む)16.5-kbにおよぶ欠失(“ABCC6del23-29” 欠失)の頻度が高いことが欧米人のPXE患者で報告されている³¹⁾³²⁾ため、本研究においてもRingpfeir³¹⁾の方法を用いて確認した。すなわち、“ABCC6del23-29” 欠失の5'末端側の欠失部位よりエクソン22側のイントロン22内にセンスプライマー (DEL-1) を (表1, 図4), “ABCC6del23-29” 欠失の3'末端側の欠失部位よりエクソン29側のイントロン29内にもう一つのセンスプライマー (DEL-2) を設定する (表1, 図4)。また、“ABCC6del23-29” 欠失の3'末端側の欠失部位より

エクソン30側のイントロン29内にアンチセンスプライマー (DEL-3) を設定する (表1, 図4)。Ringpfeir³¹⁾の方法の通りPCRを行い、反応後のDNA断片を2%アガロースゲルに泳動しエチジウムブロマイド染色後、紫外線照射装置上で観察した。正常アリルではセンスプライマー (DEL-2) とアンチセンスプライマー (DEL-3) により増幅された552bpのPCR産物が得られるが、“ABCC6del23-29” 欠失が存在する場合にはセンスプライマー (DEL-1) とアンチセンスプライマー (DEL-3) により652bpのPCR産物が得られる (552bpのPCR産物は得られない)。

7. 家系3における低比重リポ蛋白レセプター (low density lipoprotein receptor, LDL-R) 遺伝子の解析

家系3は“家族性高コレステロール血症を伴った弾力線維性仮性黄色腫の1例”として当科で以前報告された家系³⁶⁾である。しかし、家族性高コレステロール血症についても臨床診断のみであり成因であるLDL-R遺伝子異常³⁷⁾については解析されていなかった。当科においては、サザンブロッティング法³⁸⁾, PCR-SSCP法, PCR変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) 法などを用いたLDL-R遺伝子の解析を行い多くの異常を確定してきた^{39)~44)}。家系3に対しは以下に示すようにサザンブロッティング法を用いて解析を行った。

高分子DNA 5 µgを、塩基配列5'-GGATCC-3'を特異的に切断する制限酵素 *Bam* HI (和光, 東京) により至適温度37℃で12時間反応させた。反応後のDNA断片を0.8%アガロースゲルに泳動しエチジウムブロマイド染色後、紫外線照射装置上で観察した。トランスファーする膜はナイロン膜 (Nylon Membranes, Boehringer mannheim, Germany) を使用した。LDL-R遺伝子のエクソン1からエクソン18の配列を含む2.8kbのDNAプローブをlong-range PCR法により作成した。作成にあたっては、long-range PCRキット (宝酒造, 東京) ならびにジゴキシゲニン (digoxigenin, DIG) 標識核酸の酵素抗体法によるナイロン膜上の発光検出法のためにPCR DIG probe synthesis キット (Boehringer mannheim, Germany) を使用し添付説明書に従った。標準ハイブリダイゼーション緩衝液 (5xSSC, 0.1% N-ラウ

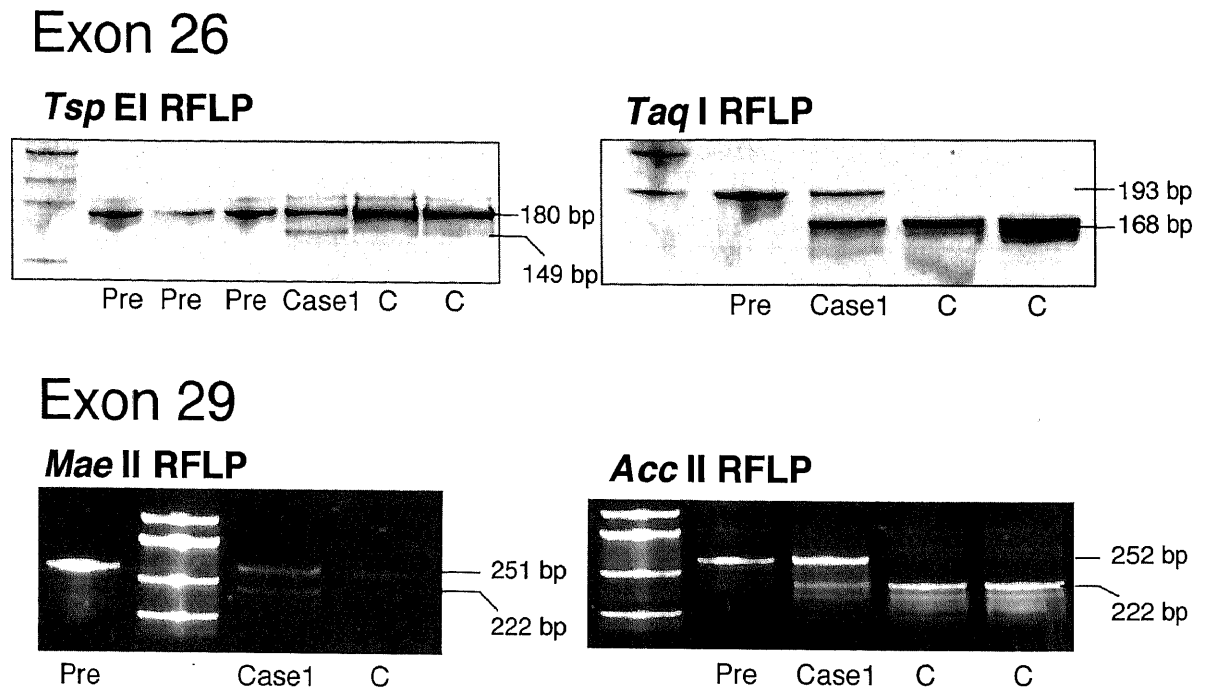
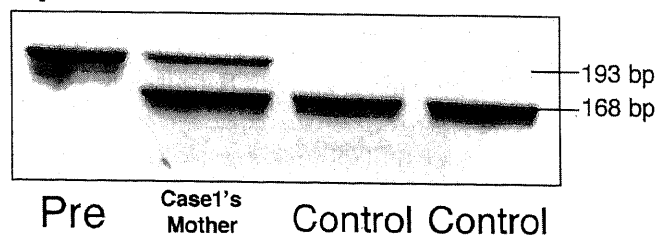


Fig. 7. The results of restriction fragment length polymorphism analysis for the case 1. Mutation R1221C predicted the creation of a novel recognition site for *Tsp* EI, and predicted the loss of a *Taq* I restriction site, in the modified restriction digests. R1357W variant is associated with the gain of a novel *Mae* II restriction endonuclease recognition site, and is associated with the loss of a *Acc* II restriction endonuclease recognition site, in the modified restriction digests. The nonconservative amino acid substitution mutations found in the case 1 were not detected in 100 clinically unaffected, unrelated control individuals. Pre, pre-digestion; C, control.

Exon 26

***Taq* I RFLP**



Exon 29

***Acc* II RFLP**

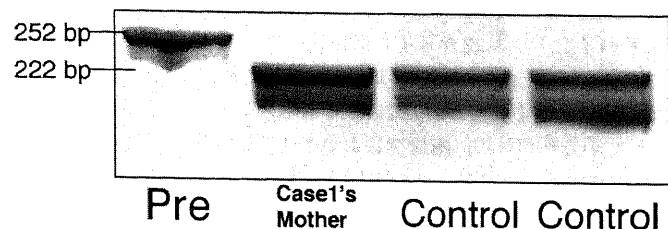


Fig. 8. The results of restriction fragment length polymorphism analysis for the case 1's mother. After the digestion of the exon 26 PCR product with *Taq* I show 193 bp and 168 bp fragments while control subjects do not show 193 bp fragment, which indicates that she is heterozygous for the R1221C mutation. After the digestion of the exon 29 PCR product with *Acc* II, only 222 bp fragment was seen, which indicates that she is negative for the R1357W mutation.

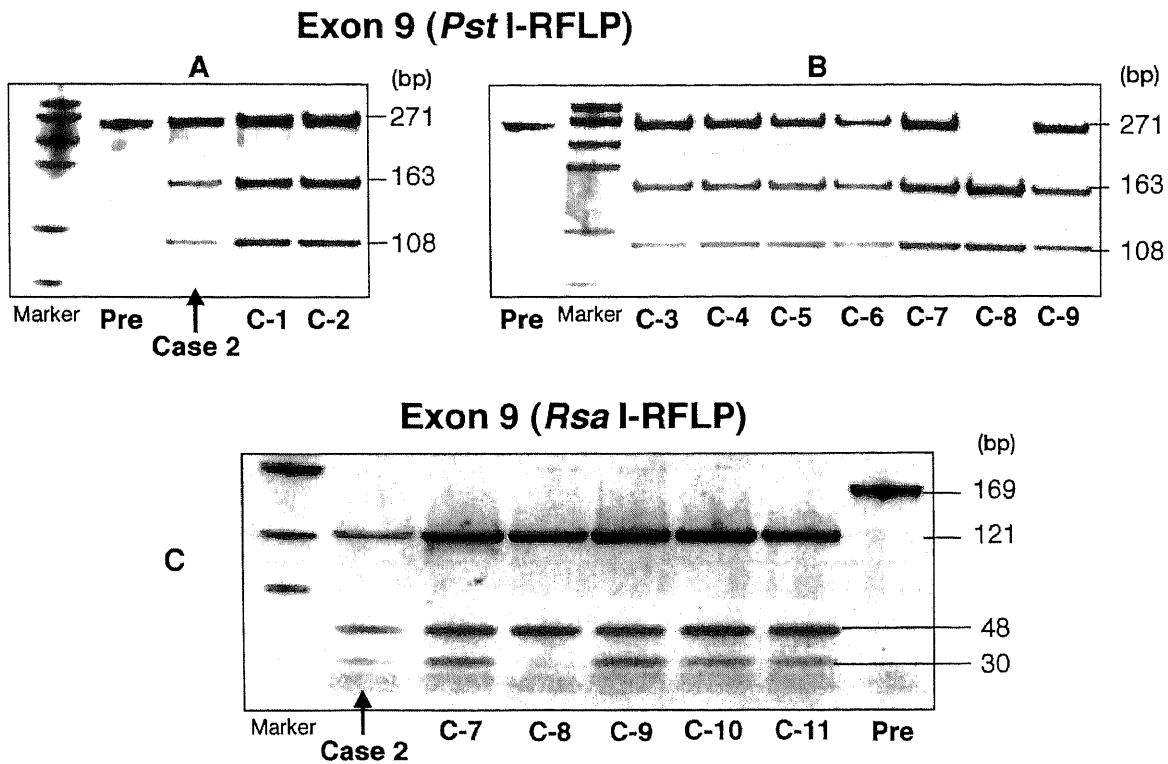


Fig. 9. The results of restriction fragment length polymorphism analysis for the case 2 and controls. Mutation Q378X predicted the loss of a *Pst* I restriction site and predicted the creation of a novel recognition site for *Rsa* I (30bp fragment). Except the C-8 control subject, all participant including the case 2 showed the result of Q378X heterozygote. Pre, pre-digestion; C, control with number 1 through 11 (C-1 to C-11).

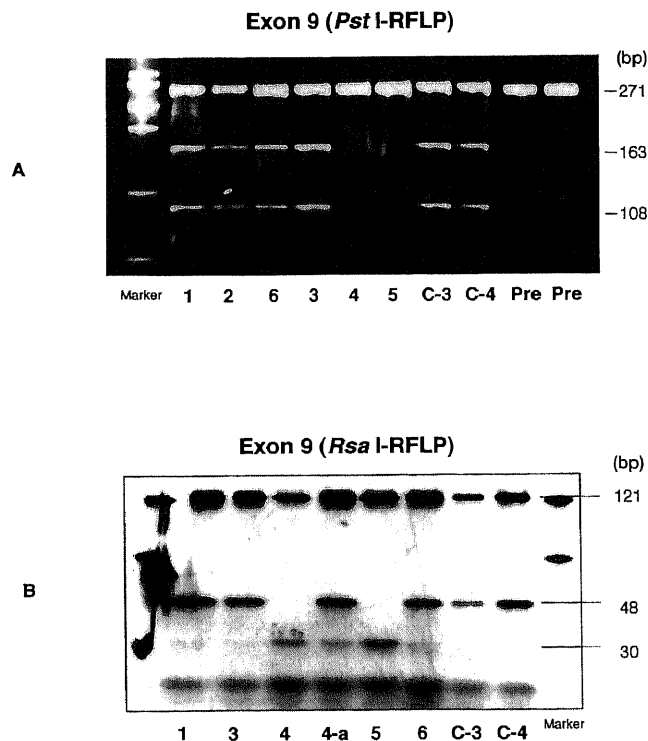


Fig. 10. The results of restriction fragment length polymorphism analysis for the case 1 through 6 and controls (C-3 and C-4). As shown in the Fig. 9. The mutation Q378X predicted the loss of a *Pst* I restriction site and predicted the creation of a novel recognition site for *Rsa* I. Case 1, 2, 3 and 6 are heterozygous for Q378X mutation. Case 4 and 5 are homozygous for Q378X mutation. "4-a" indicates the case 4's daughter and she is heterozygous for Q378X mutation.

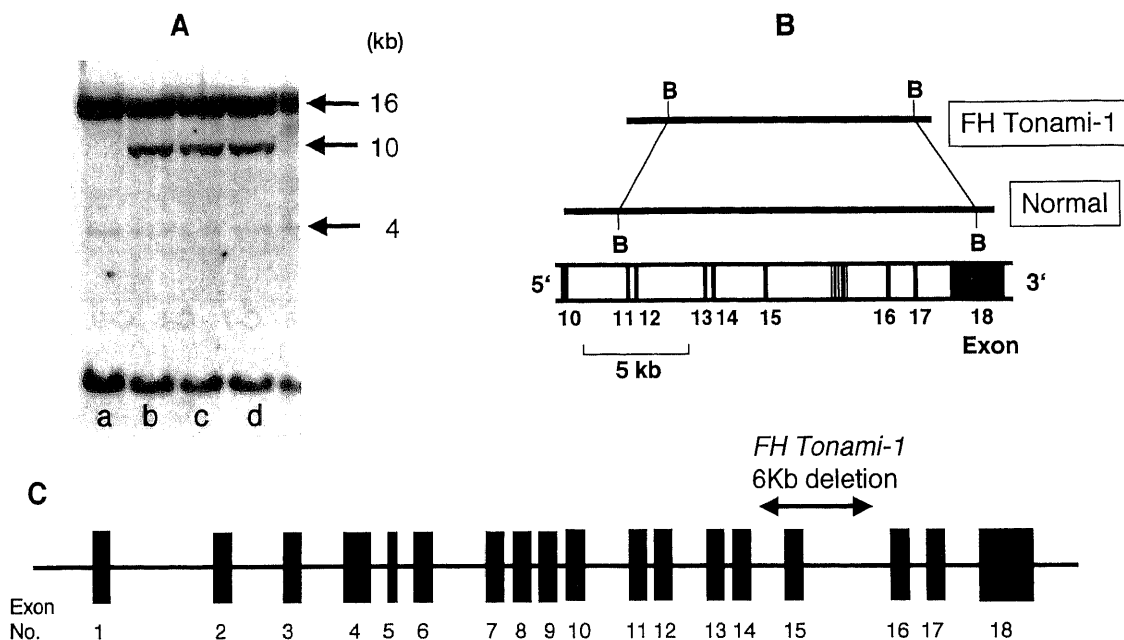


Fig. 11. (A) The result of southern blot analysis for LDL receptor gene in the family of the case 3. The proband (case 3) and proband's son have an abnormal 10-kb fragment derived from a mutant allele. a, normal control; b, positive control; c, proband (case 3); d, proband's son. (B) Comparison of restriction map of the 3' end of the normal LDL receptor gene and the 6-kb deletion mutant gene of FH Tonami-1. The solid segments indicate the exons, and the open segments indicate the introns. The *Alu* sequence in intron 15 is the shaded area. B = *Bam*HI site. (From Kajinami et al.⁴⁰ with modification) (C) The positions of FH Tonami-1 6-kb deletion mutation is indicated with respect to the exon/intron structure of LDL receptor gene. Boxes represent exons drawn approximately to scale. The number of every exon is indicated. Domain structure of the human LDL receptor protein and its relation to the exon organization of the gene is also indicated. Exon 1 is a signal sequence. Exon 2 to 6 encode the ligand binding domain. Exon 7 to 14 encode a 400-amino acid sequence that is 33 percent identical to a portion of the human epidermal growth factor (EGF) precursor. Exon 15 encode the attachment sites for O-linked carbohydrate chains. Exon 16 and the 5' end of exon 17 encode the membrane-spanning domain. The remainder of exon 17 and the 5' end of exon 18 encode the cytoplasmic domain.

ロイルサルコシン, 0.02% SDS, 1% ブロッキング試薬) にて 68℃×30 分間のプレハイブリダイゼーションを行った。その後 DIG 標識 DNA プローブ 10ng/ml を標準ハイブリダイゼーション緩衝液に加え混合したものを用いてナイロン膜を 68℃で 6 時間ハイブリダイゼーションを行った。洗浄を数回行った後ナイロン膜を標識抗体液にインキュベーションした。Disodium 3-(4-methoxy-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan-4-yl)phenylphosphate 溶液を加え発光反応を起こした後、室温で 15～25 分間 X 線フィルム (コニカ, 東京) に露出させた。

成 績

I. 家系 1 の ABCC6 遺伝子解析結果

PCR-SSCP 法によるスクリーニングにて、発端者 (症例 1) において ABCC6 遺伝子エクソン 26 とエクソン 29 に異常バンドが検出された (図 5)。

引き続き直接塩基配列決定法を行いエクソン 26 に、1221 番目のアミノ酸である Arg をコードするコドン CGC が Cys をコードするコドン TGC へと変化した変異 Arg1221Cys (R1221C) を検出した (図 6-A)。PCR-RFLP により R1221C ヘテロ接合性変異と確認された (図 7)。また、同様の PCR-RFLP を健常対照者 100 人 (200 アリル) に対して行ったが R1221C 変異は検出されなかった。

エクソン 29 では 1357 番目のアミノ酸である Arg をコードするコドン CGG が Trp をコードするコドン TGG へと変化した変異 Arg1357Trp (R1357W) が検出された (図 6-A)。PCR-RFLP により R1357W ヘテロ接合性変異と確認された (図 7)。また、同様の PCR-RFLP を健常対照者 100 人 (200 アリル) に対して行ったが R1357W 変異は検出されなかった。

症例 1 の異常は、R1221C, R1357W の複合型ヘテロ接合体と考えられた。R1221C, R1357W については報告がなく新しい変異と考えられた。

家系内で DNA の得られていた症例 1 の母親に対して解析を行った。PCR-RFLP により R1221C ヘテロ接合体であることが判明した。R1357W は検出されなかった (図 8)。

II. 家系 2 の ABCC6 遺伝子解析結果

PCR-SSCP 法によるスクリーニングにて、発端者 (症例 2) において ABCC6 遺伝子エクソン 19 に異常バンドが検出されなかったが、直接塩基配列決定法にて 848 番目コドン上の 2542 番目の塩基であるグアニンの 1 塩基欠失 (2542delG) ヘテロ接合性変異が検出された (図 6-B)。2542delG によりフレームシフトを引き起こし、エクソン 22 内のコドン 930 番目のアミノ酸であるバリンをコードするコドン GTG は、終止コドンである TGA へと変化すると考えられた。

直接塩基配列決定法にてエクソン 9 に、378 番目のアミノ酸である Gln をコードするコドン CAG がストップコドン TAG へ

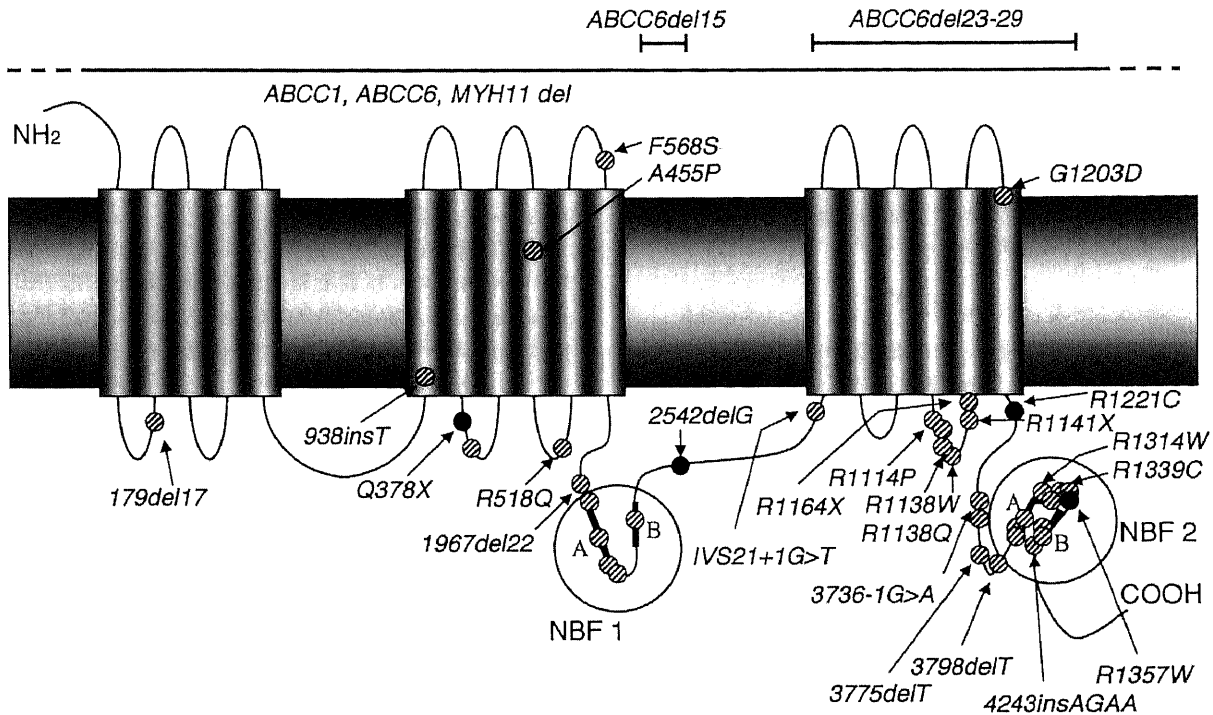


Fig. 12. Predicted topology of *ABCC6* and the location of mutations causing PXE. The three membrane-spanning domains: with five, six, and six membrane-spanning segments, respectively, the nucleotide-binding fold regions (NBF) and the Walker motifs are indicated. Shaded dots indicate the location of reported mutations causing PXE. Black dots indicate the mutations found in this study. Horizontal lines indicate three large deletions involving some or all *ABCC6* exons. The horizontal line with dashes depicts a large deletion involving all *ABCC6*, with deletion breakpoints both upstream and downstream of *ABCC6*. (From Le Saux et al.^{20/32} with modification)
NBF: nucleotide-binding fold regions, ■: Walker motifs,
●: mutations

と変化する変異 Gln378Stop (Q378X) が検出された (図 6-D)。PCR-RFLP により Q378X ヘテロ接合性変異と確認された (図 9-A)。しかしながら健常対照者 2 人も症例 2 と同様の結果を示した (図 9-A)。さらに確認するために残りの健常対照者 98 人についても確認したが、正常アレルの結果を示した 1 人を除いた残り全ては Q378X のヘテロ変異の結果となった (図 9-B)。正常アレルの結果を示した 1 人に対しては直接塩基配列決定法を行った。図 6-D に示すように 378 番目のコドンは正常配列の CAG であった。

Q378X 変異が存在すると制限酵素 *Acc II* により切断されるので、PCR-RFLP により再度確認を行ったが同様の結果であった (図 9-C)。

この結果での Q378X ヘテロ接合体の頻度は 99 % 以上となり、遺伝子頻度と遺伝子型頻度の間にみられるハーディ・ワインベルグ平衡から明らかに外れる。この結果からはエクソン 9 付近の配列と高い相同性をもった偽遺伝子上の変異の存在を考え得る。偽遺伝子上に変異が存在する場合にも Q378X ホモ接合体の場合は PCR-RFLP の結果からは偽遺伝子にも *ABCC6* 遺伝子にも Q378X が存在することになる。またナンセンス変異のため早すぎる終止コドンが導入された mRNA は消失すると考えられる (nonsense-mediated mRNA decay)。このため Q378X ホモ接合体の場合は原因遺伝子異常と考えられた。ヘテロ接合体の場合には Q378X が偽遺伝子上に存在するか *ABCC6* 遺伝子に存在するかを更に確認する必要があると考えられた。Q378X が正常例で

は逆に偽遺伝子に *ABCC6* 遺伝子置換が生じているか、または偽遺伝子の大きな欠失が考えられた。

Ⅲ. 家系 3 の *ABCC6* 遺伝子解析結果

症例 2 の場合と同様に PCR-SSCP 法によるスクリーニングにて、発端者 (症例 3) において *ABCC6* 遺伝子エクソン 19 に異常バンドは検出されなかったが、直接塩基配列決定法を行ったところ 2542 番目の塩基であるグアニンの 1 塩基欠失 (2542delG) ホモ接合性変異を認めた (図 6-C)。症例 2 の場合と同様に 2542delG によりフレームシフトを引き起こし、エクソン 22 内のコドン 930 番目のアミノ酸である Val をコードするコドン GTG は、終止コドンである TGA へと変化すると考えられた。

家系内で DNA の得られていた症例 3 の二男に対して解析を行った。直接塩基配列決定法にて 2542delG ヘテロ接合性変異を認めた (図 6-C)。

Ⅳ. 家系 4, 家系 5, 家系 6 の *ABCC6* 遺伝子解析結果

家系 4, 家系 5, 家系 6 に対しては、症例 2 に対して行った Q378X のスクリーニングを PCR-RFLP 法により行ったところ以下の結果を得た。図 10 に示すように症例 4 は Q378X ホモ接合体、症例 4 の娘 (図 10-B における 4-a) は Q378X ヘテロ接合体であった。症例 5 は Q378X ホモ接合体であった。症例 6 は Q378X ヘテロ接合体であった。

Ⅴ. “*ABCC6del23-29*” 欠失の有無の解析結果

先に述べた Ringpfeiffer³¹⁾の方法により PXE 発端者 6 人とその家族に対して解析を行ったが、“*ABCC6del23-29*” 欠失は見出

されなかった。

Ⅶ. 家系3における、LDL-R遺伝子の解析

図11-Aにサザンブロッティング法による解析の結果を示す。正常対照に見られる16kbのバンドに加え、症例3とその二男には10kbの異常バンドが検出された。図11A-bは以前Kajinamiら⁴⁰⁾が報告した6kb欠失のFH Tonami-1のヘテロ接合体の患者での結果であるが、症例3とその二男の結果はFH Tonami-1のヘテロ接合体の患者の結果と一致した。

考 察

本研究では日本人PXE患者とその家族においてABCC6遺伝子異常につきPCR-SSCP法、直接塩基配列決定法、PCR-RFLP法を用いて検討した。

未知の点変異の検出方法として現在用いられる方法には、PCR-SSCP法が従来より広く用いられてきた。一本鎖DNAはその塩基配列に依存した高次構造をとる。その構造は一塩基の置換や、欠失挿入といったわずかな違いにより多型をとり、この現象をSSCPと呼ぶ。この高次構造の違いはゲル電気泳動における移動度の差として検出できることが多く、PCR産物を変性して一本鎖として電気泳動し、これにより突然変異を検出するのがPCR-SSCP法である⁴⁵⁾。

PCR-SSCP法は比較的簡便な器具で行うことが可能でありながら遺伝子変異の検出力は80%とかなり高く、250bp程度のDNA断片で効率よく遺伝子変異を検出できる⁴⁵⁾。本法は現在までに最も汎用される遺伝子変異検出法で、当科においても八木、東方が家族性高コレステロール血症の解析にPCR-SSCP法を用いてLDL-R遺伝子をスクリーニングし、5つの新たな遺伝子変異FH Tsuruga, FH Kanazawa-2, FH Nanao, FH Yokote, FH Moriokaを確定している⁴²⁾⁴³⁾。しかしながらPCR-SSCP法の限界についても報告されており、PCR-SSCP法で検出されなかった変異をPCR-DGGE法で検出できたとの報告が多い⁴⁴⁾⁴⁶⁾⁴⁷⁾。本研究にてもPCR-SSCP法によるABCC6遺伝子をスクリーニングにては異常を検出できなかったが、直接塩基配列決定法により検出された症例が見られた時点から直接塩基配列決定法をPCR-SSCP法スクリーニングと同時進行で行った。

症例1は23歳という若年であるにもかかわらず高度の冠動脈狭窄を有した点で特筆すべきである。冠動脈造影検査の際に施行された血管内超音波による観察で、狭窄部に限らず正常と思われる部位においても内膜のエコー輝度の亢進が見られた。血管内超音波による石灰化の特徴的な所見である音響陰影は伴っていなかった。また通常の粥状硬化に見られるような脂質の貯留所見も認めず血管狭窄のメカニズムに関して非常に興味深い。検出されたR1221C, R1357Wは共に報告されていない新しい変異であった。PCR-RFLP法によりR1221C変異は母方由来と考えられた。今回対照としたPXE患者の他の5人では明らかな若年性の冠動脈狭窄は認めないためR1221C, R1357WはPXEの症状の中でも冠動脈狭窄を促進する異常である可能性があり、今後更に検討する必要があると考えられた。

家系2は血族婚のある家系である。父親と祖母に眼症状があり症例2自身も明らかな皮疹がないにもかかわらず、眼症状が強く出たため常染色体優性遺伝が当初は想定され、原因となった変異は2543delGのヘテロ接合体であると考えられた。しかし、症例3の二男が同じ2543delGのヘテロ接合体であるにもかかわらずPXEの症状が見られない事とRingpfeifferら⁴⁸⁾の最近

の総説等にはPXEは常染色体劣性遺伝疾患であり遺伝子異常が一方しか見つかっていないものは“偽優性遺伝”でありさらに検索する必要があるとされていることからさらに検索を進めた。直接塩基配列決定法により症例2はQ378Xのヘテロ接合体であることが明らかになったが、同様のPCR-RFLPを健常対照者100人に対して行い100人中99人がQ378Xのヘテロ接合体であった。

ABCC6遺伝子のエクソン1からエクソン9を含む(イントロン9の一部まで)領域と相同性の高い偽遺伝子(ABCC6 pseudogene: ψ ABCC6)が存在する事が2001年に入り相次いで報告された³²⁾⁴⁹⁾⁵⁰⁾。通常のPCRでは偽遺伝子も同時に増幅されるためにABCC6遺伝子上のエクソン1からエクソン9に変異が存在する場合、ホモ変異はヘテロ変異に、ヘテロ変異は1/4が異常シグナルを呈することになる。Q378Xはエクソン9に存在する。そのためCaiら⁴⁹⁾のようにアリル特異的なLong-range PCR法を用いて今回見出されたQ378Xが偽遺伝子に存在するのかABCC6遺伝子に存在するのかを確認する必要がある。Caiら⁴⁹⁾が報告しているように、Q378XがABCC6遺伝子に存在する場合はホモ接合体のみならずヘテロ接合体でも複合型ヘテロ接合体の一方として病因遺伝子異常となりえる。

家系3は“FHを合併したPXE”の家系として1981年に当科で報告された³⁰⁾が現在(2001年11月)においても同様の合併例は他に報告されていない。

FHはLDL-R遺伝子異常によって生ずる³⁷⁾。本症は幼少時期からの高低比重リポ蛋白コレステロール(low density lipoprotein cholesterol)血症と、アキレス腱をはじめとする腱黄色腫⁵¹⁾、および早発性冠動脈硬化症⁵²⁾を3主徴とし、常染色体優性遺伝形式をとる。遺伝子の変異によりLDL-Rに構造異常もしくは欠失が起こった結果⁵³⁾⁵⁴⁾、低比重リポ蛋白(low density lipoprotein, LDL)、および中間比重リポ蛋白(intermediate density lipoprotein)が血中で増加する³⁷⁾。LDL-R遺伝子の対立遺伝子の両方に異常があるホモ接合体の頻度は約100万人に1人であり、有効な治療が行われなければ平均26歳で全例が心臓死を遂げる⁵⁵⁾。対立遺伝子の一方のみに異常があるヘテロ接合体は一般人500人に1人以上と極めて高頻度に存在し、若年性冠動脈硬化症の主要な原因疾患である。

症例3とその二男はLDL-R遺伝子解析の結果6kb欠失が確認された。本変異はFH Tonami-1のヘテロ接合体であることが明らかになった。発端者はKajinamiら⁴⁰⁾が報告したFH Tonami-1の分布する地域である富山県砺波地方の出身であった。図11-Cに示すようにFH Tonami-1はイントロン14からイントロン15におよぶ6kbの欠失である。

家系4、家系5、家系6は3家系とも石川県能登地方の同一都市の出身であった。Q378XのスクリーニングをPCR-RFLP法により行ったところ症例4、症例5はQ378Xホモ接合体であり、症例6と症例4の娘はQ378Xヘテロ接合体であった。先に述べたようにQ378Xヘテロ接合体に関してはABCC6遺伝子上にあるかどうかさらに確認は必要である。しかし、親子であることと同じ地域出身であることを考えると症例6と症例4の娘のQ378Xヘテロ接合体は両方ともABCC6遺伝子上にある可能性が高いと考えられる。Caiら⁴⁹⁾はPXE患者のABCC6遺伝子解析において81家系中5家系(6%)で病因と考えられる遺伝子異常Q378Xがホモ接合体あるいは複合型ヘテロ接合体で認められたと報告している。本研究では6家系中2家系以上(33%以上)で

Q378Xが関与していると考えられた。

Q378X変異には偽遺伝子からの遺伝子変換の関与が考えられる⁴⁹⁾。ヒトや哺乳類の多くの遺伝子クラスターは、機能をもつ遺伝子と関連性をもった偽遺伝子(機能をもたない遺伝子)を有している。偽遺伝子と機能を有する遺伝子間の遺伝子座間配列交換は、機能をもつ遺伝子の配列の一部あるいは全部を除去あるいは変更することによって、疾患を引き起こしうる。例えば、機能をもつ遺伝子と関連する偽遺伝子間の不等交叉によって、機能をもつ遺伝子の欠失や、偽遺伝子由来の断片を含む融合遺伝子の形成を来しうる。逆に偽遺伝子は、遺伝子変換における供与配列として作用する場合や、機能をもつ遺伝子に欠失を生じる変異を導入する場合がある⁵⁰⁾。遺伝子-偽遺伝子間交換が遺伝病を引き起こす古典的な例として、ステロイド21ヒドロキシラーゼ欠損症がある。病因性の変異の95%が、機能をもつ21ヒドロキシラーゼ遺伝子CYP21Bと、それと隣接する近い偽遺伝子CYP21Aとの間の配列交換の結果として生じる。Collierらは新生(de novo)変異から疾患が発症するメカニズムを報告している⁵⁷⁾。偽遺伝子が関与する他の例として、成人性多発性嚢胞腎(Adult polycystic kidney disease)の病因であるPKD1遺伝子がある。PKD1遺伝子は第16染色体(16p13.3)の50kbにわたる範囲に46個のエクソンで構成される。もとの遺伝子(PKD1遺伝子)の5'末端を欠く短縮遺伝子(約70%の同一性を持つ)は、PKD1遺伝子のエクソン1から34とその間のすべてのイントロンが少なくとも3回忠実に複製された配列を有し、隣接する位置16p13.1に挿入されている⁵⁸⁾。

Q378X変異は石川県能登地方の同一都市出身のPXE患者に高頻度に見られたことからこの地域を起源とするPXEには遺伝子変換の関与が大きい可能性が考えられた。

図12に本研究にて検出された変異を今までの報告と併せて示す。報告されている変異の多くは想定されるABCC6蛋白のCOOH末端側の後半部に集中していることがわかる。Le Sauxら³²⁾が白人PXE患者122例で遺伝子解析した報告では全てのミスセンス変異の内の56%はエクソン24の異常、あるいは2番目のATP結合ドメイン領域(NBF2)をコードするエクソン28から30の変異であるとされるが、本研究では症例1のR1357W変異のみしか該当しなかった。また同じ研究³²⁾で、白人間でもR1141X変異は欧州のPXE患者の28.4%に認められたが、米国のPXE患者では4.1%しか認められなかった。これに対して“ABCC6del23-29”欠失は欧州のPXE患者の4.3%にしか認められなかったが、米国のPXE患者では28.4%に認められた。白人の間では比較的共通の変異とされるR1141X, “ABCC6del23-29”欠失はともに本研究では見出されなかった。日本人のPXE患者でのABCC6遺伝子異常は白人とは違った様式を示していると考えられた。

表3には本研究にて同定された遺伝子異常とそれぞれの患者の症状を示す。Le Sauxら³²⁾が白人PXE患者122例で遺伝子解析した報告と同様に本研究にても遺伝子型と表現型の間に明確な関連(Genotype-phenotype correlation)は認めなかった。

ABCC6のメッセンジャーRNAの発現は肝臓と腎臓に優位である²³⁾。しかしながら肝臓と腎臓はPXE患者では侵されない臓器である。どのようにしてABCC6遺伝子の異常が様々な臓器の弾性線維に働き病態を引き起こすかは大きな謎である。ABCC6の機能異常によりある代謝物質の障害が起こる(例えば、トランスポーターの機能異常によりある代謝物質の細胞内

蓄積が必要以上に生ずる)ことにより弾性線維の石灰化が引き起こされると考えれば、PXEは原発性の弾性線維障害よりもある種の代謝疾患であると考えられる事ができる³⁰⁾。PXEでは弾性線維が豊富な臓器である肺には殆ど異常が起こらない事実³⁾も非常に興味深い。また、幼少期のカルシウム摂取量がPXEの重症度に関係するとの報告がある⁵⁹⁾。遺伝子型と表現型の間には幾つかの段階があると考えられ環境因子の関与もあると考えれば、明らかな関連(Genotype-phenotype correlation)が見出されない事も納得できる。

ABCC6トランスポーターの基質を解明する研究は、相同性の高いABCC1のとの比較や他のABCCファミリーの機能解析をもとに行われてきた。ABCCファミリーは試験管内の実験ではロイコトリエンC4やグルタチオン抱合体を輸送することから、気管支上皮細胞などの上皮および心臓などで行われるグルタチオン抱合体の輸送、マクロファージでアナフィラキシーや喘息に関係するロイコトリエンC4の輸送に関与している可能性がある²⁵⁾。野生型マウスの耳をアラキドン酸で処理すると炎症の指標である血管透過性の亢進が見られ浮腫を起こすが、ABCC1ノックアウトマウスではこの反応が起こらない⁶⁰⁾。ABCC1ノックアウトマウスはエトポシドなどの抗ガン剤に感受性になることから、生体の広範な組織でP糖タンパク質同様、薬物・毒物の排除による生体の防御に働いていると考えられている⁶⁰⁾。ABCC1は肝細胞の基底膜側に発現しているが⁶¹⁾、通常は肝臓での発現は少ない⁶²⁾。

直接(抱合型)高ビリルビン血症を示すDubin-Johnson症候群では直接ビリルビンや他の有機アニオンの胆管への排泄が障害される。ABCC2は肝臓の胆管膜側に特異的に発現している⁶³⁾が、Dubin-Johnson症候群ではABCC2蛋白が欠損している⁶⁴⁾。

生理学的に重要なABCC1とABCC2の基質には、ロイコトリエンC4、非抱合型ビリルビン、エストロゲンのグルクロン酸抱合体、グルタチオン抱合体やグルタチオンジスルフィドが含まれる⁶⁵⁾。

ABCC6はラットで肝臓の基底膜側に主に発現し、エンドセリン受容体拮抗剤である陰性荷電ペプチドのBQ123を輸送することが明らかになっているが、“古典的”なABCC1とABCC2の基質であるロイコトリエンC4、タウロコール酸などは輸送されなかった²⁹⁾。現在不明であるヒトにおけるABCC6の基質ならびに機能の解析が進むことが期待される。

今回の研究においては同様の方法を用いて、既に報告されているものも含んだABCC6遺伝子G189C, T190C, G232A, C473T, A793G, Q378X, L381L, V614A, H632Q, T630T, P945P, R1221C, R1268QおよびR1357Wの11種のアミノ酸置換点変異と3種のサイレント点変異を検出した。アミノ酸置換点変異のうちR1221C, R1357W以外は正常対照者にも見出された。また1塩基欠失変異2542delGを見出した。

PXEは石灰化を特徴とする全身の血管病を引き起こす稀な遺伝性血管病と考えられるが、その発症頻度を16万人に1人とすると計算上のヘテロ接合性変異の保因者は約200人に1人となる。本研究での遺伝子解析は患者および家系内診断にとどまらず、虚血性心疾患患者に潜在するヘテロ接合体の保因者が血管病変(例えば血管の石灰化)の遺伝的リスクであるか検討の必要がある。またABCC6発現抑制肝細胞株の作成やPXE患者血清・尿などの精査によりABCC6トランスポーターの機能解明につながる研究を進める必要がある。本研究では日本人PXEの

中でも北陸地方に限られた比較的狭い地域での解析であったが、今後本邦の広範囲の症例の解析を行い地域差の検討が必要であろう。

結 論

日本人 PXE 患者において、ABCC6 遺伝子変異を PCR-SSCP 法、直接塩基配列決定法および PCR-RFLP 法を用いて検討し、以下の結果を得た。

1. 日本人の弾性線維性仮性黄色腫症患者に対し、原因遺伝子である ABCC6 遺伝子の変異検索を行い R1221C, R1357W, Q378X, 2542delG を見出した。R1221C, R1357W については報告がなく新しい変異と考えられた。

2. 日本人 (北陸地方) の弾性線維性仮性黄色腫症患者では、Q378X, 2542delG 変異の頻度が高い可能性が示唆された。白人の弾性線維性仮性黄色腫症患者で頻度の高いといわれる R1141X, ABCC6del23-29 等は検出されず人種による遺伝子異常の様式の違いが考えられた。Q378X には偽遺伝子からの遺伝子変換が関与していると考えられるが、白人での報告と比較して頻度が高い可能性があり、日本人の PXE 発症の共通変異として関与している可能性が示唆された。

3. 遺伝子型と表現型の関連については明らかなものは見出されなかった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師 馬淵 宏教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を直接御指導、御教示頂きました金沢大学医学部保健学科 稲津明広助教授、金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管病態制御学血管分子遺伝学 (旧内科学第二講座) 東方利徳博士、野原 淳博士に心から謝意を表します。また、多大なる御協力を頂きました金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管分子遺伝学 (旧内科学第二講座) 第一研究室の各位、ならびに高分子 DNA の採取等に際し御協力を頂いた山本幸夫氏、水野美保子技師に感謝いたします。また、貴重な症例を御紹介頂いた金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管分子科学血管新生学・結合組織代謝学 (旧皮膚科学講座) 高田 実助教授、八田尚人先生、石川県立中央病院循環器内科 宇野 欣秀先生、石川県立中央病院神経内科 坂尻顕一先生、石川県立中央病院皮膚科 筒井清広先生、流杉病院内科 風間嘉明先生、症例 1 の病理組織標本を提供頂いた石川県立中央病院病理科 車谷 宏先生、症例 2 の眼底写真を提供頂いた金沢大学大学院医学系研究科脳医学脳病態医学光情報伝達学 (旧眼科学講座) 北 勝利先生、田中伸茂先生に心から感謝いたします。

本論文の要旨の一部は、3rd FEBS Advanced Lecture Course: ATP-Binding Cassette (ABC) proteins: From Multidrug to Genetic Disease (Mar. 3-10, 2001, Gosau, Austria), 14th International Symposium on Drug Affecting Lipid Metabolism (Sep. 9-12, 2001, New York, USA), 第 74 回日本生化学会大会 (平成 13 年 10 月 25-28 日, 京都) において発表した。

文 献

- 1) Uitto J, Shamban A. Heritable skin disease with molecular defects in collagen or elastin. *Dermatol Clin* 5: 63-84, 1987
- 2) Sherer DW, Sapadin AN, Lebwohl MG. Pseudoxanthoma elasticum: an update. *Dermatology* 199: 3-7, 1999
- 3) Neldner KH. Pseudoxanthoma elasticum. *Clin Dermatol* 6: 1-159, 1988.
- 4) Pope FM. Autosomal dominant pseudoxanthoma elasticum. *J Med Genet* 11: 152-157, 1974
- 5) Pope FM. Histological evidence for the genetic heterogeneity for pseudoxanthoma elasticum. *Br J Dermatol*. 92: 493-509, 1975
- 6) Engelman MW, Fliegelman MT. Pseudoxanthoma

elasticum. *Cutis* 21: 837-840, 1978

- 7) Uitto J, Boyd CD, Lebwohl MG, Moshell AN, Rosenbloom J, Terry S. International Centennial Meeting on Pseudoxanthoma Elasticum: progress in PXE research. *J Invest Dermatol* 110: 840-842, 1998
- 8) Yap EY, Gleaton MS, Buettner H. Visual loss associated with pseudoxanthoma elasticum. *Retina* 12: 315-319, 1992
- 9) Weenink AC, Dijkman G, de Meijer PH. Pseudoxanthoma elasticum and its complications: two case reports. *Neth J Med* 49: 24-29, 1996
- 10) Mendelson G, Bulkley BH, Hutchings GM. Cardiovascular manifestations of pseudoxanthoma elasticum. *Arch Pathol Lab Med* 102: 298-302, 1978
- 11) Rigal D. Observation pour seveir à l'histoire de la chéloïde diffuse xqnthèlasmique. *Ann Dermatol Syphilol* 2: 491-501, 1881
- 12) Darier J. Pseudoxanthoma elasticum. *Monatsschr Prakt Dermatol* 23: 609-614, 1896
- 13) Christiano AM, Lebwohl MG, Boyd CD, Uitto J. Workshop on pseudoxanthoma elasticum: molecular biology and pathology of the elastic fibers. Jefferson Medical College, Philadelphia, Pennsylvania, June 10, 1992. *J Invest Dermatol* 99: 660-663, 1992
- 14) Struk B, Neldner KH, Rao VS, St Jean P, Lindpaintner K. Mapping of both autosomal recessive and dominant variants of pseudoxanthoma elasticum to chromosome 16p13.1. *Hum Mol Genet* 6: 1823-1828, 1997
- 15) van Soest S, Swart J, Tijmes N, Sandkuijl LA, Rommers J, Bergen AA. A locus for autosomal recessive pseudoxanthoma elasticum, with penetrance of vascular symptoms in carriers maps to chromosome 16p13.1. *Genome Res* 7: 830-834, 1997
- 16) Le Saux O, Urban Z, Goring HH, Csiszar K, Pope FM, Richards A, Pasquali-Ronchetti I, Terry S, Bercovitch L, Lebwohl MG, Breuning M, van den Berg P, Kornet L, Doggett N, Ott J, de Jong PT, Bergen AA, Boyd CD. Pseudoxanthoma elasticum maps to an 820-kb region of the p13.1 region of chromosome 16. *Genomics* 62: 1-10, 1999
- 17) Cai L, Struk B, Adams MD, Ji W, Haaf T, Kang HL, Dhali SH, Xu X, Ringpfeiffer F, Nancarrow J, Zach S, Schaen L, Stumm M, Niu T, Chung J, Lunze K, Verrecchia B, Goldsmith LA, Viljoen D, Figueroa LE, Fuchs W, Lebwohl M, Uitto J, Richards R, Hohl D, Ramesar R, Callen DF, Kim UJ, Doggett NA, Neldner KH, Lindpaintner K. A 500-kb region on chromosome 16p13.1 contains the pseudoxanthoma elasticum locus: high-resolution mapping and genetic structure. *J Mol Med* 78: 36-46, 2000
- 18) Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ, Terry S, Breuning M, Dauwerse H, Swart J, Kool M, van Soest S, Baas F, ten Brin JB, de Jong PT. Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 25: 228-231, 2000
- 19) Germain DP, Perdu J, Remones V, Jeunemaitre X. Homozygosity for the R1268Q mutation in MRP6, the pseudoxanthoma elasticum gene, is not disease-causing. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 297-301, 2000
- 20) Le Saux O, Urban Z, Tscuch C, Csiszar K, Bacchelli F, Quaglini D, Pasquali-Ronchetti I, Pope FM, Richards A, Terry S, Bercovitch L, de Paepe A, Boyd CD. Mutations in a gen

encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 25: 223-227, 2000

21) Ringpfeil F, Lebowitz MG, Christiano AM, Uitto J. Pseudoxanthoma elasticum: mutation in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6001-6006, 2000

22) Struk B, Cai L, Zach S, Ji W, Chung J, Lumsden A, Stumm M, Huber M, Scaen L, Kim CA, Goldsmith LA, Viljoen D, Figueroa LE, Fuchs W, Munier F, Ramesar R, Hohl D, Richards R, Neldner KH, Lindpaintner K. Mutations of the gene encoding the transmembrane transporter protein ABC-C6 cause pseudoxanthoma elasticum. *J Mol Med* 78: 282-286, 2000

23) Kool M, van der Linden M, de Haas M, Baas F, Borst P. Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res* 59: 175-182, 1999

24) Higgins CF. ABC transporters: from micro-organisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8: 67-113, 1992

25) 和田守正, 内海 健, 桑野信彦. ABC トランスポーター: 構造と機能研究の新展開. *生化学* 73(7): 537-546, 2001

26) Klein I, Sarkadi B, Varadi. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* 1461: 237-262, 1999

27) Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 42: 1007-1017, 2001

28) Belinsky MG, Kruh GD. NOAT-E (ARA) is a full-length MRP/cMOAT subfamily transporter expressed in kidney and liver. *Br J Cancer* 80: 1342-1349, 1999

29) Madon J, Hagenbuch B, Landmann L, Meier PJ, Stieger B. Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver. *Mol Pharmacol* 57: 634-641, 2000

30) Uitto J, Pulkkinen L, Ringpfeil F. Molecular genetics of pseudoxanthoma elasticum: a metabolic disorder at the environment-genome interface? *Mol Med Today* 7: 13-17, 2001

31) Ringpfeil F, Nakano A, Uitto J, Pulkkinen L. Compound heterozygosity for a recurrent 16.5-kb *Alu*-mediated deletion mutation and single-base pair substitutions in the ABCC6 gene results in pseudoxanthoma elasticum. *Am J Hum Genet* 68: 642-652, 2001

32) Le Saux O, Beck K, Sachsinger C, Silvestri C, Treiber C, Gönig HHH, Johnson EW, Paepe AD, Pope FM, Pasquali-Ronchetti I, Bercovitch L, Terry S, Boyd CD. A spectrum of ABCC6 mutations is responsible for pseudoxanthoma elasticum. *Am J Hum Genet* 69: 749-764, 2001

33) Vandenplas S, Wild I, Rabie AG, Brebner K, Ricketts M, Wallis G, Bester A, Boyd C, Mathew C. Blot hybridization analysis of genomic DNA. *J Med Genet* 21: 164-172, 1984

34) Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified α -globin and HLA-DQA DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166, 1986

35) Inazu A, Koizumi J, Haraki T, Yagi K, Wakasugi T, Takegoshi T, Mabuchi H, Takeda R. Rapid detection and prevalence of cholesteryl ester transfer protein deficiency caused

by an intron 14 splicing defect in hyperalphalipoproteinemia. *Hum Genet* 91(1): 13-16, 1993

36) 孫崎信久, 瀬尾迪夫, 京井優典, 泊 康男, 渡辺 彰, 多々見良三, 宮元 進, 馬淵 宏, 竹田亮祐. 家族性高コレステロール血症を伴った弾力線維性仮性黄色腫の1例. *日内会誌* 70(3): 69-74, 1981

37) Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In CR Scriver, AL Baudet, WS Sly, D Valle (eds), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 7th ed, p1981-2030, McGraw-Hill Book Co, New York 1995

38) Southern E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517, 1975

39) Mabuchi H, Kajinami K, Fujita H, Koizumi J, Takeda R. Mutations in the low density lipoprotein receptor gene in Japanese patients with familial hypercholesterolemia. *Ann NY Acad Sci* 598: 393-397, 1990

40) Kajinami K, Mabuchi H, Ito H, Michishita I, Takeda M, Wakasugi T, Koizumi J, Takeda R. New variant of low density lipoprotein receptor gene FH Tonami. *Arteriosclerosis* 8: 187-192, 1988

41) 梶波康二. 家族性高コレステロール血症における低比重リポ蛋白受容体遺伝子異常に関する研究. *十全医会誌* 96: 993-1007, 1987

42) 八木邦公. ホモ接合体性家族性高コレステロール血症における低比重リポ蛋白受容体遺伝子変異に関する研究. *十全医会誌* 103: 81-95, 1994

43) 東方利徳. 日本人家族性高コレステロール血症における低比重リポ蛋白受容体遺伝子変異とその頻度に関する研究. *十全医会誌* 106: 257-275, 1997

44) 野原 淳. 遺伝性高低比重リポ蛋白コレステロール血症の分子遺伝学的研究. *十全医会誌* 107: 357-371, 1998

45) Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genet* 5: 111-117, 1993

46) Moyret C, Theillet C, Puig PL, Moles JP, Thomas G, Hamelin R. Relative efficacy of denaturing gradient gel electrophoresis and single strand conformation polymorphism in the detection of mutations in exons 5 to 8 of the *p53* gene. *Oncogene* 9: 1739-1743, 1994

47) Eiken HG, Knappskog, Guldborg P, Apold J. DGGE analysis as supplement to SSCP analysis of the phenylalanine hydroxylase gene: detection of eight (one de novo, seven inherited) of nine remaining Norwegian PKU mutations. *Hum Mutat* 8: 19-22, 1996

48) Ringpfeil F, Pulkkinen L, Uitto J. Molecular genetics of pseudoxanthoma elasticum. *Exp Dermatol* 10(4): 221-228, 2001

49) Cai L, Lumsden A, Guenther UP, Neldner SA, Zach S, Knoblauch H, Ramesar R, Hohl D, Callen DF, Neldner KH, Lindpaintner K, Richards RI, Struk B. A novel Q378X mutation exists in the trans membrane transporter protein ABCC6 and its pseudogene: implications for mutation analysis in pseudoxanthoma elasticum. *J Mol Med* 79: 536-546, 2001

50) Pulkkinen L, Nakano A, Ringpfeil F, Uitto J. Identification

of ABCG6 pseudogenes on human chromosome 16p: implications for mutation detection in pseudoxanthoma elasticum. *Hum Genet* 109(3): 356-365, 2001

- 51) Mabuchi H, Itoh S, Haba T, Ueda K, Ueda R, Tatami R, Kametani T, Koizumi J, Ohta M, Miyamoto S, Takeda R, Takegoshi T. Discrimination of familial hypercholesterolemia and secondary hypercholesterolemia by Achilles' tendon thickness. *Atherosclerosis* 28: 61-68, 1977
- 52) Mabuchi H, Koizumi J, Shimizu M, Takeda R. Development of coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 79: 225-232, 1989
- 53) Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann Rev Biochem* 46: 897-930, 1977
- 54) Goldstein JL, Brown MS, Anderson RGW, Russell DW, Schneider WJ. Receptor-mediated endocytosis: Concepts emerging from the LDL receptor system. *Ann Rev Cell Biol* 1: 1-39, 1985
- 55) Mabuchi H, Tatami R, Haba T, Ueda K, Ueda R, Kametani T, Itoh S, Koizumi J, Ohta M, Miyamoto S, Takeda R, Takeshita H. Homozygous familial hypercholesterolemia in Japan. *Am J Med* 65: 290-297, 1978
- 56) Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*, 2nd ed, p229-262, BIOS Scientific Publishers Ltd, Tokyo 1999
- 57) Collier S, Tassabehji M, Sinnott P, Strachan T. A de novo pathological point mutation at the 21-hydroxylase locus: implications for gene conversion in the human genome. *Nat Genet* 3: 260-265, 1993
- 58) Watnick TJ, Gandolph MA, Weber H, Neumann HP, Germino GG. Gene conversion is a likely cause of mutation in

PKD1. *Hum Mol Genet* 7: 1239-1243, 1998

- 59) Renie WA, Pyeritz RE, Combs J, Fine SL. Pseudoxanthoma elasticum: High calcium intake in early life correlates with severity. *Am J Med Genet* 19: 235-244, 1984
- 60) Wijnholds J, Evers R, van Leusden MR, Mol CAAM, Zaman GJR, Mayer U, Beijnen JH, van der Valk M, Krimpenfort P, Borst P. Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. *Nat Med* 3: 1275-1279, 1997
- 61) Evers R, Zaman GJR, Van Deemter L, Jansen H, Calafat J, Oomen LCJM, Oude Elferink RPJ, Borst P, Schinkel AH. Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein (MRP) in polarized pig kidney cells. *J Clin Invest* 97: 1211-1218, 1996
- 62) Muller M, Jansen PLM. The secretory function of the liver: new aspects of hepatobiliary transport. *J Hepatol* 28: 344-354, 1998
- 63) Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJR, Bakker CTM, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P, Oude Elferink RPJ. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 271: 1126-1128, 1996
- 64) Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ, Tytgat GNJ, Borst P, Baas F, Oude Elferink RPJ. A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 25: 1539-1542, 1997
- 65) Konig J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461: 377-394, 1999

Gene analysis of the ATP-binding cassette transporter C6 gene in Japanese patients with pseudoxanthoma elasticum Yoshihiro Noji, Department of Molecular Genetics of Cardiovascular Disorders, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. J. Genet. Med. Soc., **111**, 2 — 19 (2002)

Key words pseudoxanthoma elasticum, ATP-binding cassette transporter protein, ABCC6, pseudogene

Abstract

Pseudoxanthoma elasticum (PXE) is a rare, inherited, systemic disease of the elastic tissue that especially affects the skin, eyes, and cardiovascular system. Recently, the ABCC6 (MRP6) gene was identified as being responsible for PXE. A defective variant of the ABCC6 (MRP6) gene (16p13.1), encoding a 1503 amino acid protein of unknown function was determined in six Japanese patients with PXE. In order to determine whether each patient had a defect in the ABCC6 gene, we examined each of 31 exons and flanking intron sequences by PCR methods (SSCP screening and direct sequencing). We found two missense variants in exons 26 and 29 in a compound heterozygous state in the first patient. One is a C to T substitution within exon 26 (R1221C) and the other is a C to T substitution within exon 29 (R1357W). These substitutions were not detected in our control panel of 200 alleles. A heterozygous one base deletion (2542delG) and a heterozygous C to T substitution in exon 9 (Q378X) were found in the second patient. The third patient was homozygous for 2542delG in the ABCC6 gene and heterozygous for a 6kb deletion of the LDL-R gene (FH Tonami-1). The fourth and the fifth patients were both homozygous for Q378X. The sixth patient was heterozygous for Q378X. The allele frequencies of 2542delG and Q378X in our Japanese PXE patients appeared higher than those in Caucasian PXE patients. The presence of one or several copies of an exon 1-9 containing ABCC6 pseudogene has been reported. To confirm that Q378X is disease causing, a long-range PCR of exon 9 starting from outside the genomic replication to circumvent interference from the ABCC6 pseudogene sequences will be needed for PXE patients heterozygous for Q378X. Because the Q378X mutation in the ABCC6 gene is derived by gene conversion from the silent Q378X variant in the ABCC6 pseudogene, gene conversion plays a significant role in the mutational event, that leads to PXE. No significant correlation could be established between the clinical manifestations and disease-causing mutations of patients with PXE.