

Identification of Novel Low-Density Lipoprotein Receptor Gene Mutations and their Frequencies in Japanese Patients with Familial hypercholesterolemia

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/2297/9325

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

金沢大学医学部医学科内科学第二講座 (主任: 馬淵 宏教授)

東 方 利 徳

家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia, FH) は高コレステロール血症, 黄色腫, 早発性冠動脈硬化症を3主徴とする常染色体優性遺伝性疾患であり, 低比重リポ蛋白受容体 (low density lipoprotein receptor, LDL-R) 遺伝子異常により発症する。日本人FHにおいては遺伝子変異の多様性が示唆されているが, 高頻度の遺伝子変異の存在の有無は明らかにされていない。そこでホモ接合体性FH 2例をそれぞれ発端者とした2家系7症例においてLDL-R遺伝子の解析を行った。さらに比較的狭い特定地域 (能登地方) 出身のFH25家系25症例を対象とし, 高頻度に集積する遺伝子変異の有無につき検討した。対象者の末梢白血球より分離した高分子DNAを用いて, LDL-R遺伝子の全18エクソンのそれぞれに対応したプライマーを設計しPCRによりDNA断片を増幅させ, PCR一本鎖構成体多型 (PCR-single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP) 法および直接塩基配列決定法 (direct sequencing) を用いて遺伝子変異の確定を行った。さらにPCR制限酵素切断多型 (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 法によりヘテロ接合体性FH 201例を対象としての決定された遺伝子変異の頻度を調べた。ホモFHを発端者としたおのおの1家系において, LDL-R遺伝子のエクソン9の新変異R395W (CGG → TGG: アルギニンからトリプトファン) およびエクソン15の新変異Q718X (CAG → TAG: グルタミンから終止コドン) を見出し, 発端者の出身地によりこれら2変異をそれぞれFH MoriokaおよびFH Yokoteと命名した。FH Moriokaのホモ接合体は著明なLDL-R活性の低下と高コレステロール血症を呈していたが, ホモ接合体性FHとしては異例の長寿であった。その機序は遺伝子変異の型やレセプター活性では説明できず, 遺伝子変異で規定されない何らかの環境因子によると推定された。さらに特定地域におけるFH 25例の遺伝子解析においてエクソン2のW23X変異 (TGG → TAG: トリプトファンから終止コドン) を見出しFH Nanaoと命名した。本変異は米国人およびドイツ系カナダ人より見い出されているFH Cincinnati-5と同一の変異であったが, 民族的背景の相違からLDL-R遺伝子における反復変異 (recurrent mutation) と考えられた。頻度調査により今回決定された3変異のうち, FH Nanaoのみが発端者家系以外の1家系において発見されたが, FH MoriokaおよびFH Yokoteは他家系に見い出されなかった。したがってこれら3変異はいずれも高頻度である可能性は低く, 特定地域内に高頻度に集積する遺伝子変異の存在も否定的であり, 日本人FHにおける遺伝子変異の多様性が示唆された。

Key words familial hypercholesterolemia, low density lipoprotein receptor, gene mutation, genetic epidemiology

動脈硬化性疾患のうち冠動脈疾患は, 近年欧米のみならず日本においても死因の上位を占めるようになった。高コレステロール血症がこのような冠動脈疾患の最大の危険因子であることはもはや疑う余地のない事実となり¹⁾, 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素A (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 還元酵素阻害剤によるコレステロール低下療法により, 冠動脈疾患未発症の高コレステロール血症患者の心筋梗塞発症と心血管系疾患による死亡率が低下したという報告もなされている²⁾。

家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia, FH)³⁾は幼少時よりの高低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein,

LDL) コレステロール血症, アキレス腱をはじめとする腱黄色腫⁴⁾, および早発性冠動脈硬化症⁵⁾を3主徴とする常染色体優性遺伝性疾患であり, 高LDLコレステロール血症と冠動脈硬化症との関連⁶⁾の解明に重要なモデル疾患である。本症はLDL受容体 (LDL receptor, LDL-R) 遺伝子の変異⁷⁻⁹⁾によりLDL-Rに構造異常もしくは欠失が起こった結果, LDL, 中間比重リポ蛋白 (intermediate density lipoprotein, IDL), 超低比重リポ蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) の血中濃度が上昇して発症する¹⁰⁾。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性FHは約100万人に1人, 一方のみに異常があるヘテロ接合体性FHは500人に1人以上の頻度で認められ, ホモ接合体

平成9年1月31日受付, 平成9年3月17日受理

Abbreviations : Arg, arginine; Asp, aspartic acid; Cys, cysteine; ddA, dideoxy adenine; ddATP, dideoxy adenine triphosphate; ddC, dideoxy cytosine; ddCTP, dideoxy cytosine triphosphate; ddG, dideoxy guanine; ddGTP, dideoxy guanine triphosphate; ddT, dideoxy thymine; dNTP, deoxy nucleotide triphosphate; dTTP, deoxy thymine triphosphate; EGF, epidermal growth factor; FH, familial hypercholesterolemia; HDL, high density lipoprotein; HDL-C,

性FHは平均26歳で全例が心臓死を遂げる¹⁰⁾。またヘテロ接合体性FHでは、男性の方が約10年冠動脈疾患の発症が早く女性では閉経後冠動脈疾患を発症することが知られているが⁸⁾、ホモ接合体ではそのような性差はみられなくなる。

ヒトのLDL-Rは839アミノ酸よりなる糖蛋白で、細胞膜を1

回貫通するタイプの細胞膜レセプターである。LDL-Rの構造遺伝子は第19番染色体の短腕近位部 (p13.1-13.3) に存在し¹¹⁾、全長45キロ塩基対 (kilobase pair, kbp) で17イントロン18エクソンからなり、5.3kbpのmRNAをコードする¹²⁾¹³⁾。

このLDL-Rの遺伝子のいずれの部位に変異が発生してもFH

Table 1. Clinical data of M.N. family and N.S. family

Patient	(initial)	Age (year)	Sex	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	ATT (mm)
M.N. family						
Proband	(M.N.)	72	F	697	96	17
Sister	(N.N.)	69	F	690	102	30
Brother	(A.I.)	74	M	323	166	Thick
N.S. family						
Proband	(N.S.)	2	F	596	146	Not thick
Father	(H.S.)	30	M	342	102	Not thick
Mother	(Y.S.)	24	F	346	341	Not thick
Brother	(W.S.)	2 mo	M	188	/	Not thick

M, male ; F, female ; mo, month ; TC, total cholesterol ; TG, triglyceride ; ATT, Achilles tendon thickness on X-ray film ; Thick, more than 9 mm ; Not thick, less than 8 mm ; /, not examined. All values were obtained during pre-treatment period.

Table 2. Clinical data of the patients with familial hypercholesterolemia examined in Noto area

Subgroup	Patient number	Sex	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	ATT (mm)
Heterozygote	1	M	365	403	16
	2	M	255	76	13
	3	F	300	202	10
	4	F	254	156	Thick
	5	M	273	165	Thick
	6	M	217	50	22
	7	F	278	94	13
	8	F	296	87	Thick
	9	M	265	80	17
	10	F	334	50	Thick
	11	M	399	78	19
	12	M	280	321	12
	13	M	307	125	19
	14	M	238	145	Thick
	15	M	311	106	Not thick
	16	M	259	176	Thick
	17	F	266	135	10
	18	F	341	291	13
	19	F	376	134	14
	20	F	216	60	11
	21	F	327	107	Not thick
	22	F	308	121	Not thick
	23	M	305	224	Thick
	24	M	284	125	10
Homozygote	25	M	500	291	28

M, male ; F, female ; TC, total cholesterol ; TG, triglyceride ; ATT, Achilles tendon thickness on X-ray film ; Thick, more than 9 mm ; Not thick, less than 8 mm. All values were obtained during pre-treatment period.

high density lipoprotein cholesterol; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; IDL, intermediate density lipoprotein; Kbp, kilobase pair; LDL, low density lipoprotein; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; LDL-R, low density lipoprotein receptor; PCR-SSCP, polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism; PCR-

が発症するが、LDL-Rの合成、機能のどの段階で障害が起るかによって1型、合成障害 (class 1, receptor synthesis defective), 2型、細胞内転送障害 (class 2, transport defective), 3型、LDL結合障害 (class 3, ligand binding defective), 4型、LDL細胞内取込み障害 (class 4, internalization defective), 5型、レセプター再利用障害 (class 5, recycling defective) の5つの機能的クラスに分類される³⁾。

従来本症の診断はその臨床像により行われることがほとんどであったが、1984年Yamamotoら¹⁴⁾によりヒトLDL-R遺伝子のcDNAがクローニングされて以来、本症に対する遺伝子レベルでの検討が可能になった。以後報告されたLDL-Rの遺伝子変異数は1992年のHobbsの総説では150種類に上っている¹⁵⁾。その多様性は当初の予想を大きく上回るものであり、その後も報告が相次いでいる。本症の診断、更にはホモ接合体、ヘテロ接合体の鑑別も臨床像からだけでなく、遺伝子解析からもなされるようになってきており、いまやFHは遺伝子レベルで最も解明の進んだ疾患の一つとなった。

遺伝子解析によりFHを早期診断する重要性はもとより、FHという一つの疾患概念の中で、個々の家系、或るいは個々の症例が示す臨床症状の多様性が遺伝子レベルで規定されていることが明らかとなれば、それに基づいた病態の把握、更には治療法の選択へと可能性が開かれ、その意義は大きい。近年米国では本症に対する遺伝子治療の成績が報告されるに至っていることから¹⁶⁾、遺伝子解析の意義は高まっている。

LDL-Rの遺伝子変異のスクリーニングおよび確定のためにまずサザンブロッティング法¹⁷⁾を中心とした技法が用いられてきた。当科においてもMabuchiら¹⁸⁾およびKajinamiら^{19)・20)}がサザンブロッティング法にてFH Tonami-1, FH Tonami-2, FH Okayama, FH Kanazawa-1の遺伝子異常を確定した。しかしサザンブロッティング法で確定された変異は全変異の10数%のみであり、サザンブロッティング法では見い出せない数塩基対以内の小変異がFH全体の約90%を占めると考えられていた。

1989年のPCR一本鎖構成体多型 (PCR-single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP) 法^{21)・22)}の出現により、FHのみならず巨大な遺伝子を対象とした疾患の遺伝子レベルでの検討が一気に加速した。当科でも八木がFHのLDL-R遺伝子変異の検索にPCR-SSCP法および直接塩基配列決定法 (direct sequencing)^{23)・24)}を、さらに変異のスクリーニングと確認のためにPCR制限酵素切断多型 (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 法^{25)・26)}を導入し、2つの新たな遺伝子変異FH Tsuruga, FH Kanazawa-2を確定した²³⁾。しかしこれらをあわせても北陸地区のFHを説明しうるのは15.5%に過ぎず、高頻度に集積する遺伝子変異の存在に関心が持たれていた。

血族結婚のないホモ接合体性FH家系から見い出された遺伝子変異は高頻度に分布している可能性が高いことから、今回私はPCR-SSCP法および直接塩基配列決定法を用いて、ホモFHを発端者とした2家系においてLDL-R遺伝子の解析を行った。その結果2つの新たな遺伝子変異を見い出した。

またFHにおいては地理的、人種的、宗教的理由により孤立

した環境で増加していった集団において、ある特定の遺伝子変異が高頻度集積するといういわゆる創始者効果 (founder effect)²⁴⁾が認められる場合がある。南アフリカ人、フランス系カナダ人、フィン人がその代表であるが²⁵⁾、日本人FHにおける創始者効果の有無は明らかにされていない。そこで今回さらに比較的狭い特定地域出身のFHを対象とし、そこに高頻度に集積する遺伝子変異の有無につき検討し、1変異を決定した。

そしてこれら3つの変異のスクリーニングのためにPCR-RFLP法を用い、日本人FHにおけるこれらの変異の頻度につき検討した。

対象および方法

I. 対 象

馬淵らの診断基準²⁶⁾、すなわち1) 血清総コレステロール230mg/dl以上で腿黄色腫を認めること、2) 一親等内に本症があり血清総コレステロール230mg/dl以上であること、のいずれかを満足する北陸地方を中心に見い出されたFH症例のうち、

1. 血清総コレステロール濃度、アキレス腱肥厚の程度、家系調査などの臨床像からホモ接合体性FHと考えられた2例をそれぞれ発端者とする2家系7症例 (表1)。

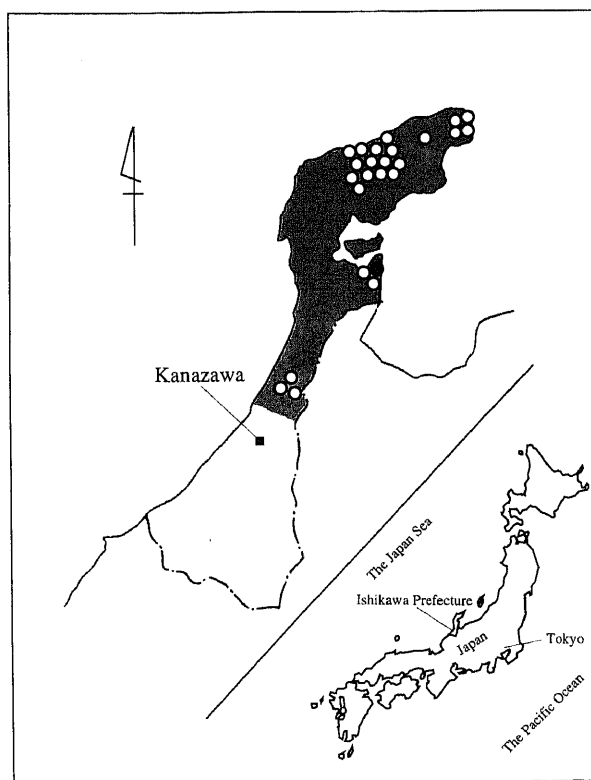


Fig. 1. Geographical distribution of homozygous and heterozygous patients with familial hypercholesterolemia (FH) examined in Noto area in Ishikawa Prefecture, Japan. Noto area is located on peninsula part of Ishikawa prefecture (gray). ●, homozygote; ○, heterozygote.

RFLP, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism; PNK, polynucleotide kinase; TBE, Tris-boric acid-EDTA; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; Tyr, tyrosine; Trp, tryptophan; VLDL, very low density lipoprotein

2. 北陸地区において歴史的、地理的に他区域からの家系の流入が少ないと考えられる能登地方(石川県河北郡以北)出身のFHで、血縁のない25家系25症例(ホモ接合体1例, ヘテロ接合体24例)(表2, 図1).

3. ヘテロ接合体性FHで上記と異なる家系由来の201症例.

上記1, 2を遺伝子解析の対象とし, 3を決定された遺伝子変異のスクリーニングの対象とした.

II. 方 法

1. 高分子DNAの抽出

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℃にて移送し-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³⁰⁾にて高分子DNAを単離した. すなわち320mMショ糖液, 1%トライトンX-100, 5mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl, pH7.6を含む融解液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(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10mM Tris-HCl, 1mM EDTA-2Na, pH8.0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

Leitersdolfらの報告³⁷⁾およびジーンバンクのデータベースに登録されているヒトLDL-R遺伝子配列をもとに, 18エクソンすべてについて設計した25塩基長前後のプライマー計19組を作成した(表3). エクソン4は400bp以上となりPCR-SSCP法に用いるには大き過ぎるため2つに分割した.

プライマーはDNA合成機モデルABI381A (Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA)を用いペーテシアノエチルホスホアミダイド法³⁸⁾にて合成した. アンモニア水に溶解し55℃で一晩静置したうえで-20℃に冷却, 真空下で遠心して乾燥, 再滅菌蒸留水1mlに溶解しカラムNAP-5 (Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden)に通して精製した. そこで200倍に希釈し260nmでの吸光度より濃度を測定し10pMになるように濃度を調整した.

DNA断片の増幅にはSaikiら³⁹⁾によるPCR法を用いた. 高分子DNA 1μgを鋳型DNAとして40pMのプライマー1セットと200μMの各デオキシヌクレオチド(dATP, dCTP, dGTP, TTP)と2.5単位のTaqポリメラーゼ(Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, USA)を10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl,

Table 3. Oligonucleotides flanking exons of the LDL-receptor gene for PCR amplification

Exon	Oligonucleotide name	Sequence
1	SP90	5'-CAT TGA AAT GCT GTA AAT GAC GTG G-3'
	SP91	5'-TTC TGG CGC CTG GAG CAA GCC TTA C-3'
2	SP57	5'-CCT TTC TCC TTT TCC TCT CTC TCA G-3'
	SP58	5'-AAA ATA AAT GCA TAT CAT GCC CAA A-3'
3	SP59	5'-TGA CAG TTC AAT CCT GTC TCT TCT G-3'
	SP60	5'-AAT AGC AAA GGC AGG GCC ACA CTT A-3'
4	4A-1	5'-GTT GGG AGA CTT CAC ACG GTG ATG G-3'
	4A-2	5'-ACT TAG GCA GTG GAA CTC GAA GGC C-3'
	4B-1	5'-CCC CAG CTG TGG GCC TGC GAC AAC G-3'
	4B-2	5'-GGG GGA GCC CAG GGA CAG GTG ATA G-3'
5	SP62	5'-CAA CAC ACT CTG TCC TGT TTT CCA G-3'
	SP63	5'-GGA AAA CCA GAT GGC CAG CGC TCA C-3'
6	SP64	5'-TCC TTC CTC TCT CTG GCT CTC ACA G-3'
	SP65	5'-GCA AGC CGC CTG CAC CGA GAC TCA C-3'
7	SP66	5'-AGT CTG CAT CCC TGG CCC TGC GCA G-3'
	SP67	5'-AGG GCT CAG TCC ACC GGG GAA TCA C-3'
8	SP68	5'-CCA AGC CTC TTT CTC TCT CTT CCA G-3'
	SP69	5'-CCA CCC GCC GCC TTC CCG TGC TCA C-3'
9	SP70	5'-CCT GAC CTC GCT CCC CGG ACC CCC A-3'
	SP71	5'-GGC TGC AGG CAG GGG CGA CGC TCA C-3'
10	SP72	5'-ATG CCC TTC TCT CCT CCT GCC TCA G-3'
	SP73	5'-AGC CCT CAG CGT CGT GGA TAC GCA C-3'
11	SP74	5'-CAG CTA TTC TCT GTC CTC CCA CCA G-3'
	SP75	5'-TGG CTG GGA CGG CTG TCC TGC GAA C-3'
12	SP76	5'-TCT CCT TAT CCA CTT GTG TGT CTA G-3'
	SP77	5'-CTT CGA TCT CGT ACG TAA GCC ACA C-3'
13	SP78	5'-GTC ATC TTC CTT GCT GCC TGT TTA G-3'
	SP79	5'-GTT TCC ACA AGG AGG TTT CAA GGT T-3'
14	Oligo1	5'-CCT GAC TCC GCT TCT TCT GCC -3'
	Oligo2	5'-CCA CAC CTG TGA GGC AGC TCC -3'
15	SP82	5'-AGA AGA CGT TTA TTT ATT CTT TCA G-3'
	SP83	5'-GTG TGG TGG CGG GCC CAG TCT TTA C-3'
16	SP84	5'-CCT CAC TCT TGC TTC TCT CCT GCA G-3'
	SP85	5'-CGC TGG GGG ACC GGC CCG CGC TTA C-3'
17	SP86	5'-TGA CAG AGC GTG CCT CTC CCA ACA G-3'
	SP87	5'-TGG CTT TCT AGA GAG GGT CAC ACT C-3'
18	SP150	5'-TCC GCT GTT TAC CAT TTG TTG GCA G-3'
	SP11	5'-GCT TTG GTC TTC TCT GTC TTT GAA T-3'

Oligonucleotides complementary to DNA sequences flanking exons of the human LDL receptor gene were synthesized on ABI 380A DNA synthesizer and used to amplify the intervening sequences with PCR.

1.5mM MgCl₂, 0.01%ゼラチンを含む緩衝液に加え再滅菌蒸留水を加え計50 μ lとなるようにして撹拌した。遠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 $^{\circ}$ C, 1分, 68 $^{\circ}$ C, 3分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30サイクルの反応を行った。エクソン9のPCRではSP70 (5'-CCT GAC CTC GCT CCC CGG ACC CCC A-3'), SP71 (5'-GGC TGC AGG CAG GGG CGA CGC TCA C-3') のプライマーを用いて伸長反応温度68 $^{\circ}$ Cで反応を行った。エクソン15のPCRではSP82 (5'-AGA AGA CGT TTA TTT ATT CTT TCA G-3'), SP83 (5'-GTG TGG TGG CGG GCC CAG TCT TTA C-3') のプライマーを用いて伸長反応温度62 $^{\circ}$ Cで行った。エクソン2のPCRではSP57 (5'-CCT TTC TCC TTT TCC TCT CTC TCA G-3'), SP58 (5'-AAA ATA AAT GCA TAT CAT GCC CAA A-3') のプライマーを用いて伸長反応温度62 $^{\circ}$ Cで行った。

増幅したDNA断片は3%低融点アガロースゲル (Nusieve, FMC Corporation, Rockland, USA) にサイズマーカー Φ -X174/*Hae* III ダイジェスト (東洋紡, 東京) と共に泳動して断片長を確認し、濃度の検討をつけた上でクロロホルムで抽出した。

3. PCR-SSCP法

泳動用緩衝液として Tris-HCl 54g, ホウ酸 27.5g, 0.5M EDTA 20ml に蒸留水を加え3000mlにしたものを保存用の5x Tris-ホウ酸-EDTA(Tris-boric acid-EDTA, TBE) 泳動用緩衝液とし泳動直前に1xの濃度に希釈した。

0.5mM EDTA 2 μ l, 5N NaOH 10 μ l, 滅菌再蒸留水 88 μ l を混

合し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 $^{\circ}$ C 3分, 95 $^{\circ}$ C 5分加熱後、-20 $^{\circ}$ Cに急冷し一本鎖に変性させた。その上で10-20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲル (アトー, 東京) を用いてTBE緩衝液中で4 $^{\circ}$ Cのもと100Vで泳動し、泳動時間はエクソン毎に決定した。エクソン9およびエクソン15の場合には14時間、エクソン2の場合には12時間泳動した。

染色にはBIO-RAD 銀染色キット (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) を用いプロトコルに従って銀染色を行った。10%メチルアルコール100mlにて30-60分間ゲルの固定を行い酸化剤100mlにて5分間酸化させた。蒸留水で15分間に6-7回水を換えながらすすぎ余分な酸化剤を除き、銀染色溶液を加え20分以上振とうさせた。その後30秒以内に洗浄し現像液を加えバンドの出現を確認した。ある程度以上バンドが濃くなった時点で5%酢酸100mlを5分間加え反応を停止させ、蒸留水で洗浄し30%メチルアルコール100mlに3日間以上浸してゲルを収縮させ、グリセオールを両面に均等に塗布して水に浸したセルロースフィルム二枚の間にはさみ正方形の枠に固定して乾燥させた。

4. 直接塩基配列決定法 (direct sequencing)

1) ラジオアイソトープ直接塩基配列決定法

クロロホルムで抽出したPCR産物を用い、セントリコン-30 (Amicon, Denver, USA) に再滅菌蒸留水2mlを入れ、PCR産物100-150 μ lを加え2000回転30分間遠心した。これにより30 μ lに濃縮すると同時に余分なプライマーおよびヌクレオチ

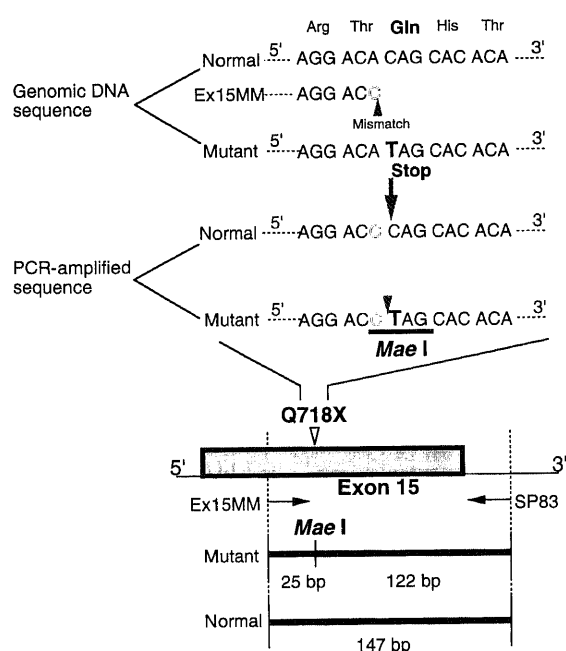


Fig. 2. Rapid detection method for an exon 15 nonsense mutation (Q718X) employing the mutagenic primer-mediated restriction map modification. Using a mutagenic primer Ex15MM and a reverse primer SP83, gene amplification by PCR introduced an artificial *Mae* I site in the PCR product only for the C to T mutated allele (Q718X). Digestion of the PCR products with *Mae* I generates polymorphic restriction fragments of 147 bp and/or 122 bp. Heterozygotes show double band of 147 bp and 122 bp.

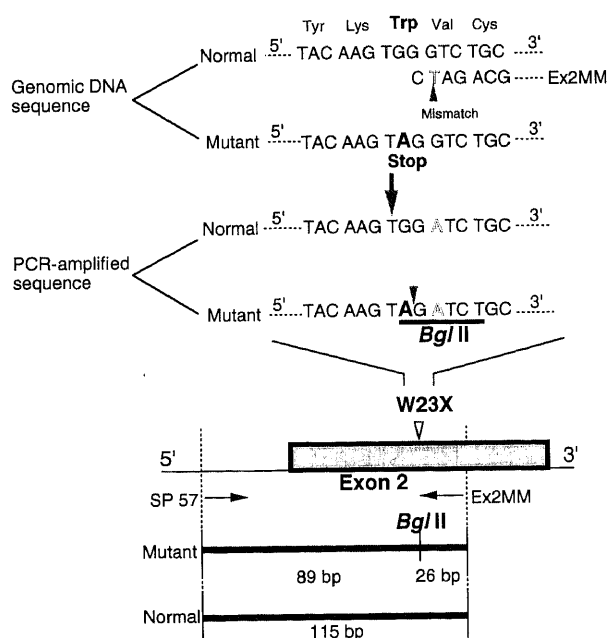


Fig. 3. Rapid detection method for an exon 2 nonsense mutation (W23X) employing the mutagenic primer-mediated restriction map modification. Using a mutagenic primer Ex2MM and a reverse primer SP57, gene amplification by PCR introduced an artificial *Bgl* II site in the PCR product only for the G to A mutated allele (W23X). Digestion of the PCR products with *Bgl* II generates polymorphic restriction fragments of 115 bp and/or 89 bp. Heterozygotes show double band of 115 bp and 89 bp.

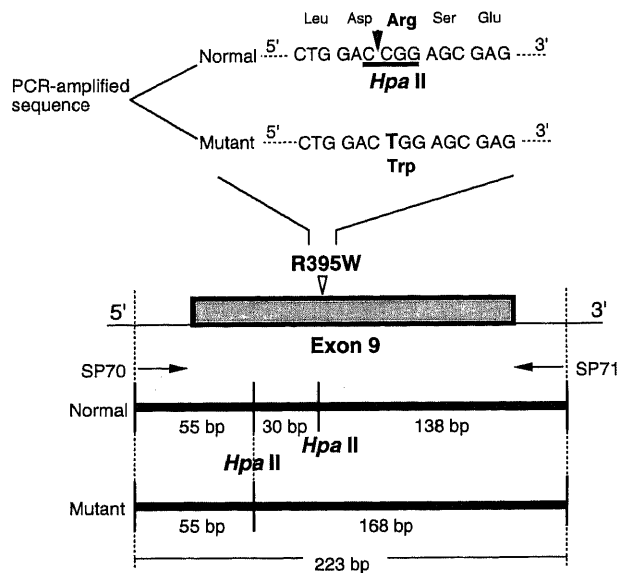


Fig. 4. Rapid detection method for an exon 9 missense mutation (R395W) employing the mutation-mediated restriction map modification. Using one pair of primers SP70 and SP71, gene amplification by PCR introduced two *Hpa* II sites in the PCR product for the normal allele, but only one 5' terminal side *Hpa* II site in the PCR product for C to T mutated allele (R395W). Digestion of the PCR products with *Hpa* II generates polymorphic restriction fragments of 168 bp and/or 138 bp. Heterozygotes show double band of 168 bp and 138 bp.

ドを除去し、それを直接塩基配列決定法用の鋳型DNAとした。

10pMのプライマー3 μ lをT4ポリヌクレオチドキナーゼ (poly-nucleotide-kinase, PNK, 東洋紡) 1 μ l, 10x PNK反応緩衝液1 μ l, 32 P- γ ATP (>185TBq/mM, 37MBq/ml) (Amersham, Buckinghamshire, UK) 5 μ lを混合し37 $^{\circ}$ C, 60分反応させ95 $^{\circ}$ C, 5分でPNKを失活させ5'末端をRI標識した。

ジデオキシ法⁴⁰⁾の改良版であるHiguchiらのプロトコル²⁹⁾に従ってTthポリメラーゼ (オートサイクルシーケンスキット, Autocycle Sequencing Kit, Pharmacia-LKB)を用い反応を行った。即ち鋳型DNA 0.2–4 μ g, 蛍光もしくはRI標識した1pMプライマー2 μ l, 反応用緩衝液2 μ l, デオキシヌクレオチド三リン酸 (deoxy nucleotide triphosphate, dNTP) 溶液5 μ l, 反応直前に希釈用緩衝液で1.25単位/ μ lとしたTthポリメラーゼ2 μ lに再滅菌蒸留水を総量18 μ lとなるように追加し攪拌の上遠心したものを4 μ lずつとり、反応用マイクロチューブにとり冷却しておいた各ジデオキシアデニン三リン酸 (dideoxy adenine triphosphate, ddATP), ジデオキシシトシン三リン酸 (dideoxy cytosine triphosphate, ddCTP), ジデオキシグアニン三リン酸 (dideoxy guanine triphosphate, ddGTP), dTTP溶液2 μ lずつに加え50 μ lのミネラルオイルを上に加えて滴下し、95 $^{\circ}$ C, 36秒, 72 $^{\circ}$ C, 1分24秒で25回反応させ終了後に反応停止液4 μ lを加えて–20 $^{\circ}$ Cに保存し、泳動直前に95 $^{\circ}$ C, 5分に続き–20 $^{\circ}$ Cに急冷し泳動した。

その上で6–8%のポリアクリルアミドゲル[アクリルアミド/ビス(19:1)] (Pharmacia-LKB) で電圧1200–2000V, 8–12時間の電気泳動を行い、終了後ゲルを濾紙に貼付し水流ポンプにて陰圧にしながら80 $^{\circ}$ Cに加熱して乾燥させた。乾燥後X線フィルムに24–72時間露光しフィルムを現像し、オートラジオグラムを得た。

エクソン2および9ではTthポリメラーゼでHiguchiらのプロ

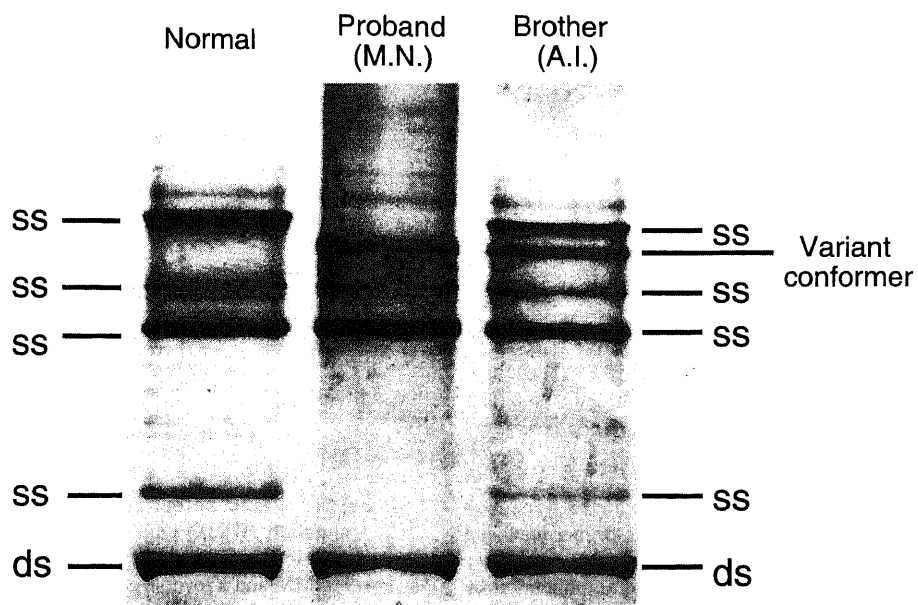


Fig. 5. PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analysis in the exon 9 of low density lipoprotein-receptor (LDL-R) gene. The bars along the left side indicate the wild pattern (normal). The proband (M.N.) shows the mutational pattern with variant conformer, and the brother (A.I.) shows the coexistence of the wild pattern and mutational pattern. ss, single strand band; ds, double strand band.

トコールに従って反応を行った。泳動は40cm長の8%ポリアクリルアミドゲルを用い、室温のもとTBE泳動用緩衝液で1200V、エクソン2では4時間、エクソン9では8時間かけて泳動した。ゲルを乾燥してX線フィルムに72時間露光しオートラジオグラムを得た。

2) 非ラジオアイソトープ直接塩基配列決定法

PCRで増幅したDNA断片を1%の通常のアガロースゲルにサイズマーカーΦ-X174/*Hae*IIIダイジェスト(東洋紡)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。ゲルネブライザー、マイクロピュア、マイクロコン-30 (Amicon) を組み合わせたカラムにこのゲル断片と再滅菌蒸留水100μlを入れ、14,000gで20分間遠心した。これにより30μlに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。

ラジオアイソトープによる方法と同様、Higuchiらのプロトコールに従ってTthポリメラーゼを用いた非ラジオアイソトープDNAシーケンシングキット(シーケンシングハイブラスー, 東洋紡)で反応を行った。

即ち鋳型DNA 0.2–4μg, 1pMプライマー 2μl, サイクルシーケンシング反応緩衝液3μl, dNTP溶液1–2μl, 反応直前に希釈用緩衝液で4単位/μlとしたTthポリメラーゼ1μlに再滅菌蒸留水を総量17–18μlとなるように追加し攪拌の上遠心したものを4μlずつとり、反応用マイクロチューブにとり冷却しておいた各ビオチン-ddGTP, ビオチン-ddATP, ビオチン-ddTTP (Mg⁺), ビオチン-ddCTP (Mg⁺) 溶液2μlずつに加えた。この際 ビオチン-ddTTP, ビオチン-ddCTPにはそれぞれビオチン-ddTTP:MgCl₂ = 1:1, ビオチン-ddCTP:MgCl₂ = 3:1の割合でMgCl₂を調整した。これに50μlのミネラルオイルを上に加えて、エクソン15の場合95℃, 30秒, 61℃, 15秒, 60℃, 240秒で

30回反応させ終了後に反応停止液4μlを加えて–20℃に保存し、泳動直前に80℃, 5分に続き–20℃に急冷し泳動した。

その上で6–8%のポリアクリルアミドゲルで電圧1000–1400V, 3–6時間の電気泳動を行い、終了後ゲルに専用メンブレン (Hybond™-N⁺, Amersham) を貼りし8時間以上ブロッキングした。ブロッキング終了後ビオチン–アビジン系による標識系とアルカリフォスファターゼ-PPDによる検出系を利用した非ラジオアイソトープ検出キット(イメージングハイケミルミ, 東洋紡)を用いてビオチン標識DNAを化学発光させ、X線フィルムに30分–2時間露光しフィルムを現像し、オートラジオグラムを得た。

エクソン15ではこのTthポリメラーゼを用いた非ラジオアイソトープDNAシーケンシングキットを用いて反応を行った。泳動は40cm長の7%ポリアクリルアミドゲルを用い、室温のもとTBE泳動用緩衝液で1200V, 4時間かけて泳動した。ビオチン標識DNAを化学発光させ、X線フィルムに1時間露光しフィルムを現像し、オートラジオグラムを得た。

5. PCR-RFLP法

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じるようにプライマーを設計した。一侧に通常のプライマーを用い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。その上でピペ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緩衝液を加え酵素の至適温度条件下にて6時間反応させた。そして10–20%アクリルアミドゲルに反応産物を適当な大きさのサイズマーカーと共に泳動して、切断の有無で変異の検出およびホモ接合体とヘテロ接合体との鑑別を行った。

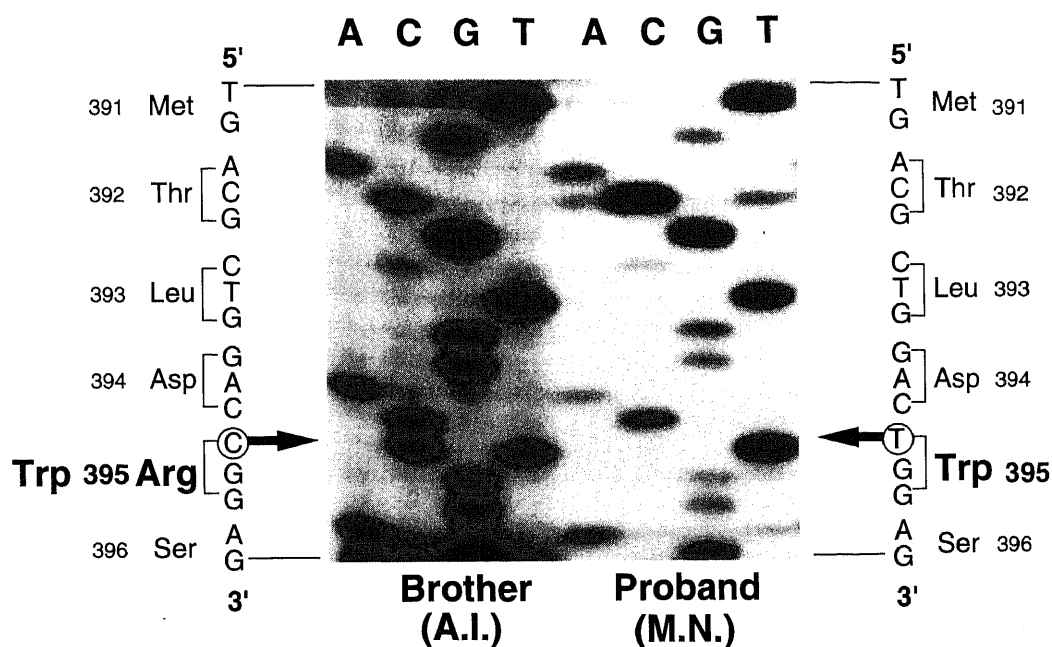


Fig. 6. Sequencing analysis in the exon 9 of LDL-R gene. The circles at the both sides indicate the position of C to T mutation at the codon 395. Proband (M.N.) shows the mutational band (T), indicating the homozygote of this mutation. Brother (A.I.) shows the coexistence of the mutational band (T) and wild band (C), indicating the heterozygote. The numbers along both sides indicate the codon numbers of the LDL-R gene. Met, methionine; Thr, threonine; Leu, leucine; Asp, aspartic acid; Arg, arginine; Trp, tryptophan; Ser, serine.

エクソン 15 では変異配列でのみ制限酵素 *Mae* I (東洋紡) による切断部位が出現するように設計した 5' 末端用変異プライマー Ex15MM (5'-GGT CAG CTC CAC AGC CGT AAG GAC C-3') を設計した。

5' 末端側に Ex15MM を用い 3' 末端側に SP83 を用いて 95℃, 1分, 61℃, 3分, 30 サイクルの温度条件での PCR 法により DNA 断片を増幅した。その上でミネラルオイルの下層より PCR 産物を 7μl 取り出し, 10x 制限酵素 *Mae* I 用反応緩衝液 1μl と制限酵素 *Mae* I 2μl を加え 45℃ で 6 時間切断反応させた。そして 10-20% アクリルアミドゲルに 10μl の反応産物, 制限酵素を作用させていない PCR 産物, サイズマーカー φ-X174/*Hae* III ダイジェストを同時に泳動した。制限酵素を作用させていない 147bp の PCR 産物と同じ大きさのバンドしか観察されなければ切断はなく対立遺伝子のいずれにも同変異は存在せず, 切断された 122bp のバンドのみならば本変異のホモ接合体, 両方が認められれば同じくヘテロ接合体と判断した (図 2)。

同様にエクソン 2 では変異配列でのみ制限酵素 *Bgl* II (東洋紡) による切断部位が出現するように設計した 3' 末端用変異プライマー Ex2MM (5'-GGC ACT CAG CGC TGC CAT CGC AGA TC-3') を設計した。5' 末端側に SP57 を用い 3' 末端側に Ex2MM を用いて 95℃ 1分, 64℃ 3分 30 サイクルの温度条件での PCR を行い, PCR 産物 7μl, 10x 制限酵素 *Bgl* II 用反応緩衝液 1μl と制限酵素 *Bgl* II 2μl を加え 37℃ で 6 時間切断反応させ, エクソン 15 と同様にアクリルアミドゲルに泳動した。制限酵

素を作用させていない 115bp の PCR 産物と同じ大きさのバンドしか観察されなければ切断はなく対立遺伝子のいずれにも同変異は存在せず, 切断された 89bp のバンドのみならば本変異のホモ接合体, 両方が認められれば同じくヘテロ接合体と判断した (図 3)。

一方エクソン 9 では変異配列のスクリーニングには変異プライマーは用いず 5' 末端側に SP70 を用い 3' 末端側に SP71 を用いた通常の PCR 産物に制限酵素 *Hpa* II (東洋紡) を 37℃ で 6 時間切断反応させた。エクソン 9 内には正常の塩基配列において 2 か所 *Hpa* II の認識配列が存在するが, 変異の存在によりこのうち 3' 末端側一か所の配列が変化し制限酵素による切断を受けなくなる。その結果 5' 末端側一か所のみが制限酵素により切断された結果生ずる 168bp バンドしか観察されなければ二つ対立遺伝子のいずれにも本変異が存在するホモ接合体と判断, 二か所が切断されて生ずる 138bp のバンドと一か所のみが切断されて生ずる切断された 168bp のバンド両方が認められれば本変異のヘテロ接合体, 二か所が切断されて生ずる 138bp のバンドのみが認められれば変異を有しないと判断した (図 4)。

6. 血清脂質の分析

対象者は 16 時間絶食後の早朝空腹時に静脈採血し, 血清総コレステロール (total cholesterol, TC), 中性脂肪 (triglyceride, TG) は酵素法で測定した⁴⁰⁻⁴⁴⁾。高比重リポ蛋白コレステロール (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) は沈澱法で測定した⁴⁵⁾。低比重リポ蛋白コレステロール (low density

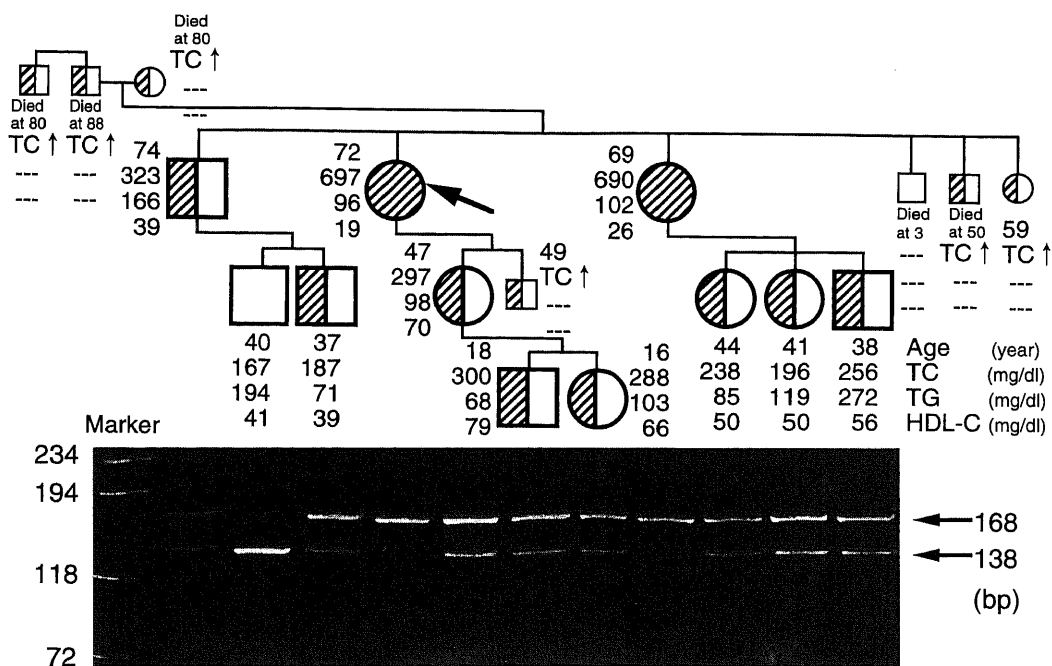


Fig. 7. The pedigree and result of PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of M.N. family. The arrow in the pedigree indicates the proband. Digestion of the PCR products with *Hpa* II generates polymorphic restriction fragments of 168 bp and/or 138 bp. The proband and her sister show 168 bp fragment only, which indicates the homozygotes for FH Morioka mutation. All other patients with hypercholesterolemia show both 168 bp and 138 bp fragments, which indicate the heterozygotes for FH Morioka mutation. This pedigree shows that patients with FH Morioka have a tendency of relative longevity not only in homozygotes but also in heterozygotes. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. ⊗, homozygous patient with FH Morioka; ⊠, heterozygous patient with FH Morioka; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol. All values were obtained at the age shown in the pedigree during pre-treatment period. TC ↑, a patient with hypercholesterolemia (The values of TC were not examined); ---, not examined; Marker, the molecular size marker of φ X174 double strand DNA digested with *Hae* III.

lipoprotein cholesterol, LDL-C) はFriedewaldの式⁴⁰⁾で算出した。

成 績

I. FH Moriokaの同定

1. PCR-SSCP法による異常構成体の検出

ホモ接合体性FH M.N.を発端者とする家系におけるPCR-SSCP法によるスクリーニングにおいて、LDL-R遺伝子のエクソン9に異常構成体が検出された。図5は正常者および、発端者M.N.とその兄A.I.のSSCP泳動パターンである。発端者には正常者には認められない1本のSSのバンドが、その兄には正常者と発端者の両方のバンドが見い出された。PCR産物の大きさには正常者、発端者とその兄に差はなく、異常バンドの出現パターンと併せて発端者はエクソン9内の小変異のホモ接合体でその兄は同変異のヘテロ接合体の可能性が高いと考えられた。

2. 直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列の決定

発端者M.N.およびその兄A.I.のLDL-Rエクソン9における塩基配列解析の結果を図6に示した。正常者ではCのバンドのみ存在している位置に発端者ではTのバンドのみ観察され、その兄にはCとTのバンド両方が観察された。したがって本変異はエクソン9内のCからTへの1塩基置換であり、発端者M.N.は同変異のホモ接合体、兄A.I.はヘテロ接合体と確認された。

本変異によりLDL-Rの395番目のアミノ酸アルギニン

(arginine, Arg) がトリプトファン (tryptophan, Trp) に置換されることになる(R395W)(図6)。本変異はこれまでに報告がなく、発端者の出身地よりFH Moriokaと命名した。

3. PCR-RFLP法による発端者家系内での変異の確認

図7に発端者M.N.の家系図とPCR-RFLP法による変異の確認結果を示した。両親に血族結婚はなく、69才の妹N.N.も発端者と同様本変異のホモ接合体と確認された。

4. 同変異での血清脂質値および臨床像の検討

図7に発端者家系内で遺伝子上本変異を有することが確認されたホモ接合体およびヘテロ接合体症例の血清脂質値を示し、表4にホモ接合体、ヘテロ接合体ごとの平均値を示した。発端者および妹の血清脂質値は発端者TC 697mg/dl, LDL-C 659mg/dl, TG 96mg/dl, HDL-C 19mg/dl, 妹TC 690mg/dl, LDL-C 644mg/dl, TG 102mg/dl, HDL-C 26mg/dlと著明な高LDLコレステロール血症を呈していた。姉妹とも25才頃より黄色腫を認め、黄色腫は眼瞼、鼻根部、肘部、手背、足背、アキレス腱と全身に認められた。いずれも30才頃より高コレステロール血症を指摘されており、60才頃より狭心症発作を認めはじめ加療されているが、ホモ接合体性FHで72才および69才という年齢は異例の長寿であった。また、ヘテロ接合体では血清脂質値の平均値はTC 261 ± 50 mg/dl, LDL-C 180 ± 44 mg/dl, TG 123 ± 68 mg/dl, HDL-C 56 ± 15 mg/dl ($\bar{x} \pm SD$)であり、本家系ではヘテロ接合体においても長寿傾向が認められた。

Table 4. Lipoprotein profiles of homozygous and heterozygous patients with FH Morioka

Subgroup	Number of patients	Age (year)	TC (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)
Homozygotes	2	71	694	652	99	23
Heterozygotes	8	39 $\pm$ 18	261 $\pm$ 50	180 $\pm$ 44	123 $\pm$ 68	56 $\pm$ 15

TC, total cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol (calculated by Friedewald formula); TG, triglyceride; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol. All values were obtained during pre-treatment. Values represent $\bar{x} \pm SD$.

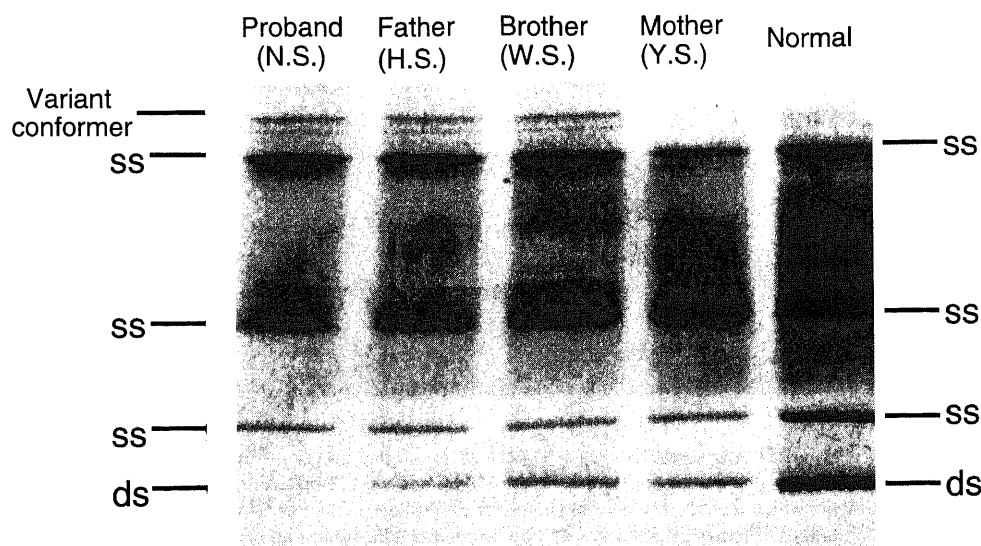


Fig. 8. PCR-SSCP analysis in the exon 15 of LDL-R gene. The bars along the right side indicate the wild pattern (normal). Although mother (Y.S.) show the wild pattern, the proband (N.S.), father (H.S.) and brother (W.S.) show the coexistence of the wild pattern and mutational pattern with variant conformer. ss, single strand band; ds, double strand band.

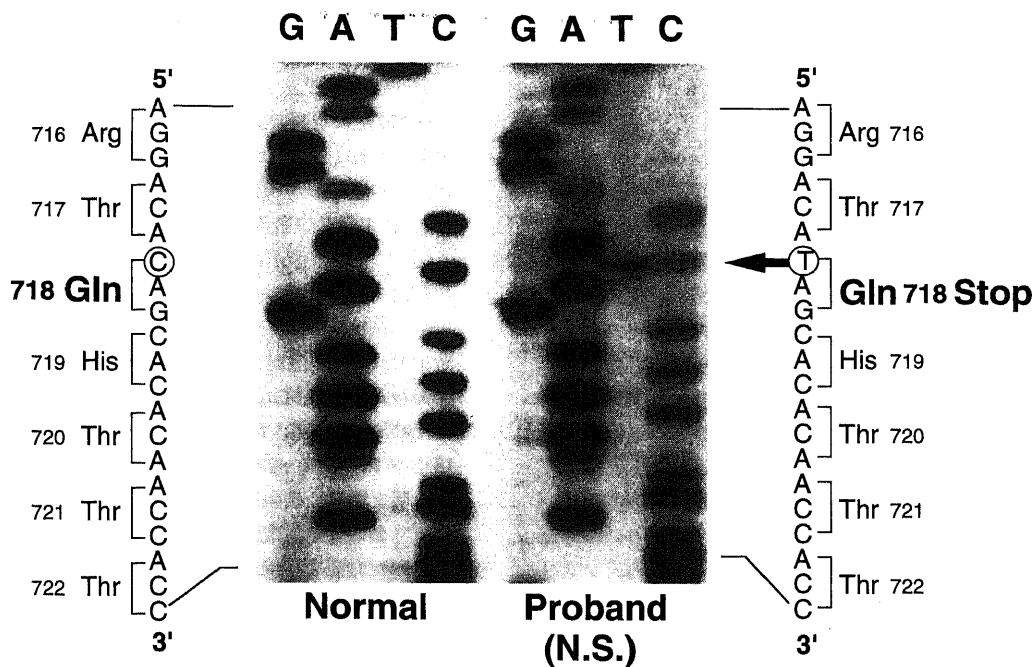


Fig. 9. Sequencing analysis in the exon 15 of LDL-R gene. The circles at the both sides indicate the position of C to T mutation at the codon 718. Proband (N.S.) shows the coexistence of the mutational band (T) and wild band (C), indicating the heterozygote of this mutation. Control (normal) shows the C residue, indicating the wild type. The numbers along both sides indicate the codon numbers of the LDL-R gene. Arg, arginine; Thr, threonine; Gln, glutamine; His, histidine; Stop, stop codon.

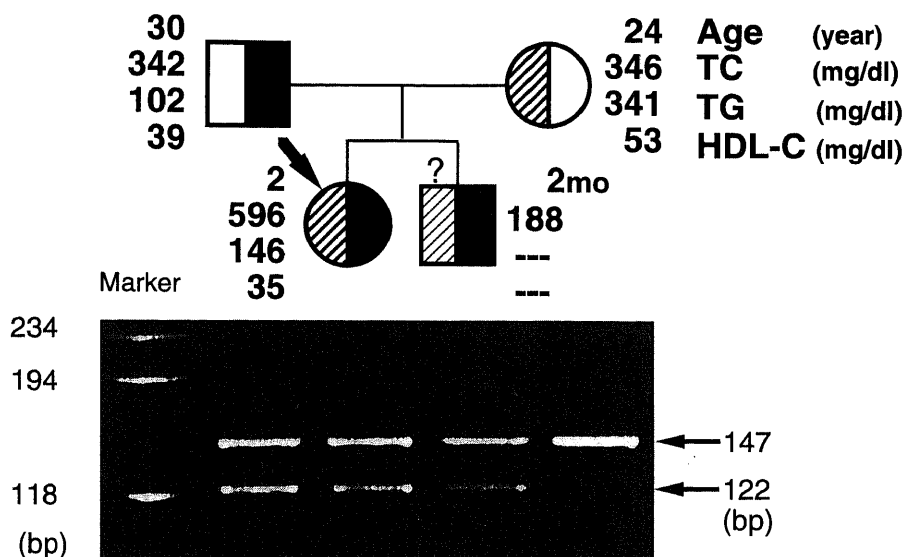


Fig.10. The pedigree and result of PCR-RFLP analysis of N.S. family. The arrow in the pedigree indicates the proband. Digestion of the PCR products with *Mae* I generates polymorphic restriction fragments of 147 bp and/or 122 bp. All of the proband, her father and brother show 147 bp and 122 bp fragments which indicate the heterozygotes for FH Yokote mutation. The mutation of proband and her brother were derived from their father, and their mother don't show 122 bp fragment. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. ■, heterozygous patient with FH Yokote; ○, heterozygous patient with unknown mutant; ●, compound heterozygous patient with FH Yokote and unknown mutant. TC, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; mo, month. All values were obtained at the age showed in the pedigree during pre-treatment period. ---, not examined; Marker, the molecular size marker of ϕ X174 double strand DNA digested with *Hae* III.

5. 北陸地区における頻度調査

ヘテロ接合体性FH 201症例に対しPCR-RFLP法にて本変異の頻度調査を行ったが他の家系に検出されなかった。

II. FH Yokoteの同定

1. PCR-SSCP法による異常構成体の検出

ホモ接合体性FH N. S.を発端者とする家系におけるPCR-

SSCP法によるスクリーニングにおいて、LDL-R遺伝子エクソン15に異常構成体が検出された。図8は正常者および、発端者N. S.とその父H. S., 弟W. S., 母Y. S.のSSCP泳動パターンである。発端者とその父および弟に正常者と異なる1本のバンドが認められた。異常バンドの出現パターンから発端者とその父および弟はエクソン15内の小変異のヘテロ接合体である可能

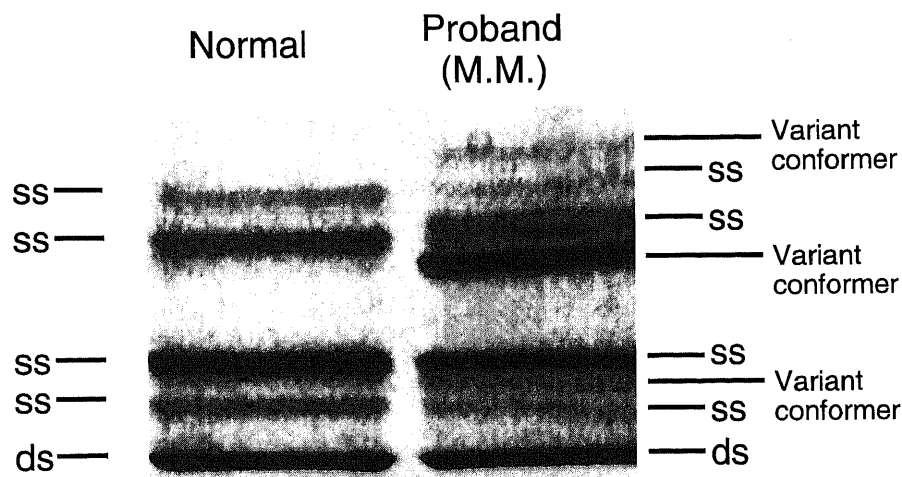


Fig. 11. PCR-SSCP analysis in the exon 2 of LDL-R gene. The bars along the left side indicate the wild pattern (normal). The proband (M.M.) shows the coexistence of the wild pattern and mutational pattern with variant conformers. ss, single strand band; ds, double strand band.

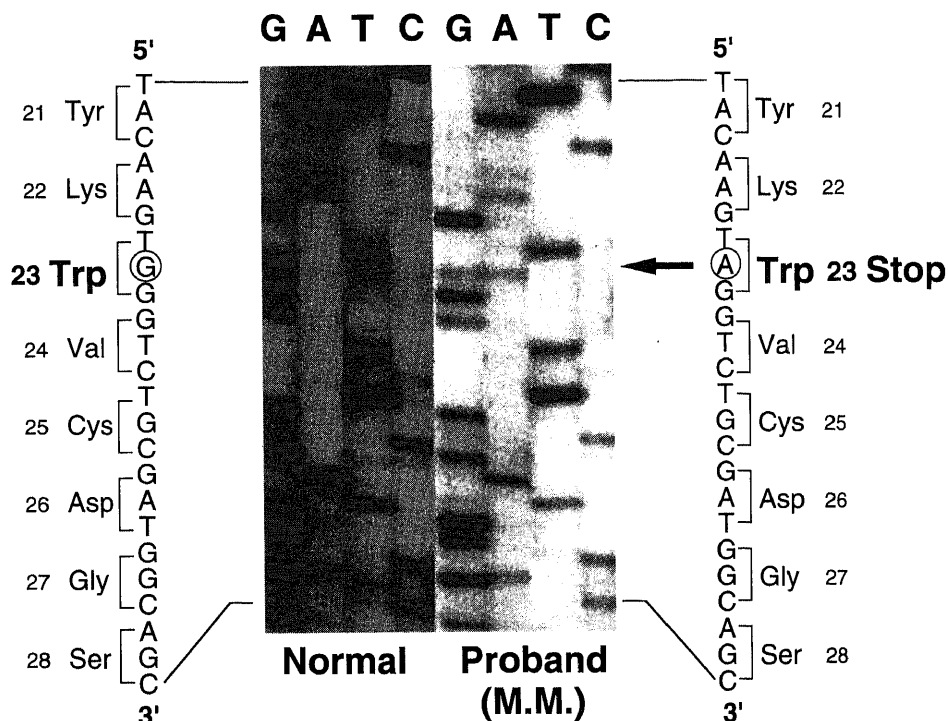


Fig. 12. Sequencing analysis in the exon 2 of LDL-R gene. The circles at the both sides indicate the position of G to A mutation at the codon 23. Proband (M.M.) shows the coexistence of the mutational band (A) and wild band (G), indicating the heterozygote of this mutation. Control (normal) shows the G residue, indicating the wild type. The numbers along both sides indicate the codon numbers of the LDL-R gene. Tyr, tyrosine; Lys, Lysine; Trp, tryptophan; Val, valine; Cys, cysteine; Asp, aspartic acid; Gly, glycine; Ser, serine; Stop, stop codon.

性が高いと考えられた。

2. 直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列の決定

この発端者の LDL-R 遺伝子エクソン 15 における非 RI 直接塩基配列決定法による解析の結果を図 9 に示した。正常者では C のバンドのみ存在している位置に発端者 N. S. では C と T のバンド両方が観察された。したがって本例はエクソン 15 の C から T への 1 塩基置換であり発端者は同変異のヘテロ接合体と確認さ

れた。

本変異により LDL-R の 718 番目のアミノ酸グルタミン (glutamine, Gln) に対応する配列が終止コドン (stop codon) に置換されることになる (Q718X) (図 9)。本変異はこれまでに報告がなく、発端者の出身地より FH Yokote と命名した。

3. PCR-RFLP 法による発端者家系内での変異の確認

図 10 に発端者の家系図と PCR-RFLP 法による変異の確認の結果

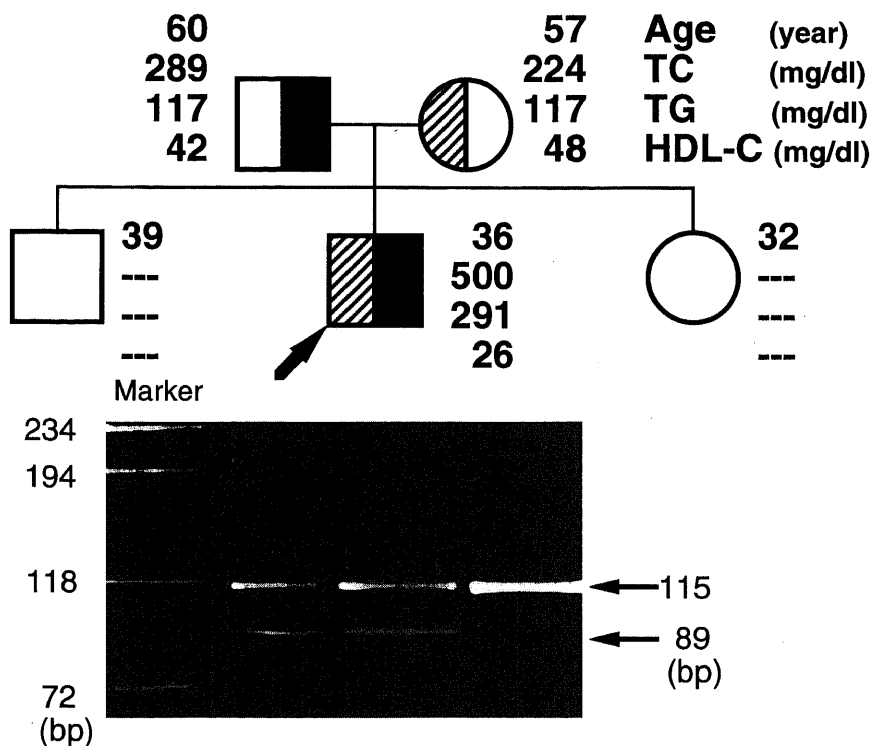


Fig.13. The pedigree and result of PCR-RFLP analysis of M.M. family. The arrow in the pedigree indicates the proband. Digestion of the PCR products with *Bgl* II generates polymorphic restriction fragments of 115 bp and/or 89 bp. The proband and his father show 115 bp and 89 bp fragments which indicate the heterozygotes for FH Nanao mutation. The mutation of proband was derived from his father, and his mother don't show 89 bp fragment. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. ■, heterozygous patient with FH Nanao; ◐, heterozygous patient with unknown mutant; ◑, compound heterozygous patient with FH Nanao and unknown mutant. TC, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; All values were obtained at the age showed in the pedigree during pre-treatment period. ---, not examined; Marker, the molecular size marker of ϕ X174 double strand DNA digested with *Hae* III.

Table 5. Frequencies of LDL-receptor gene mutations in Hokuriku district according to screening studies of 201 FH families

Names of mutation	LDL-receptor mutation	Number of families	Frequency (%)
FH Tonami-1*	intron14-intron15 6kb deletion	10	5.0
FH Tonami-2*	intron1-intron3 10kb deletion	11	5.5
FH Okayama*	intron7-intron14 13kb deletion	2	1.0
FH Kanazawa-1*	intron1-intron4 12kb deletion	1	0.5
FH Tsuruga**	D280Y	1	0.5
FH Kanazawa-2**	P664L	6	3.0
FH Morioka***	R395W	1	0.5
FH Yokote***	Q718X	1	0.5
FH Nanao***	W23X	2	1.0
Total		35	17.5

*, identified by Southern blotting¹⁸⁾⁻²²⁾; **, identified by PCR-SSCP and direct sequencing³³⁾; ***, identified in this study.

を示した。両親に血族結婚はなく本変異は父親由来であり、発端者、父親および弟は遺伝子上本変異のヘテロ接合体であると確認された。また母親は本変異を有しないことが確認された。

4. 同変異での血清脂質値および臨床像の検討

発端者N.S.は2才の女兒、血清脂質値はTC 596mg/dlであり、その父親はTC 342mg/dl、母親はTC 346mg/dlであることから、発端者は臨床的にホモ接合体性FHと診断されていた。また弟は生後2か月の時点でTC 188mg/dlであることから発端者と同様ホモ接合体性FHである可能性も疑われていた⁴⁷⁾。しかし発端者は遺伝子上ヘテロ接合体であり、臨床像と併せて複合型ヘテロ接合体と考えられ、また父親および弟はヘテロ接合体と考えられた。また母親は別の変異を有することが推定され、弟もその変異を有する可能性が残る。

5. 北陸地区における頻度の調査

ヘテロ接合体性FH 201症例に対しPCR-RFLP法にて本変異の頻度調査を行ったが同変異は他の家系に検出されなかった。

Ⅲ. 能登地方出身のFH 25家系での検討

1. PCR-SSCP法による異常構成体の検出

能登地方出身のFH (表2, 図1)を対象としたPCR-SSCP法によるスクリーニングにおいて、ホモ接合体性FH M. M.のLDL-R遺伝子エクソン2に異常構成体が検出された。図11は正常者および、発端者M. M.のSSCP泳動パターンである。発端者には正常者と異なる3本のバンドが認められた。異常バンドの出現パターンより発端者はエクソン2内の小変異のヘテロ接合体である可能性が高いと考えられた。

2. 直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列の決定

この発端者M. M.のLDL-Rエクソン2におけるRI直接塩基配列決定法による解析の結果を図12に示した。正常者ではGのバンドのみ存在している位置に発端者ではGとAのバンド両方

が観察された。本例はエクソン2内のGからAへの1塩基置換であり発端者は同変異のヘテロ接合体と確認された。

本変異によりLDL-Rの23番目のアミノ酸Trpに対応する配列が終止コドン (stop codon) に置換されることになる(W23X) (図12)。本変異はPCR-SSCP法、直接塩基配列決定法を用いて1992年にHobbsらにより米国人及びドイツ系カナダ人のFH症例に見出されている¹⁵⁾。しかし、民族的背景から共通の祖先を有するとは考え難く、同じ遺伝子変異が異なる時期に異なる日本の症例に新たに起こったもの、即ち反復変異 (recurrent mutation)⁴⁸⁾⁴⁹⁾と考え、発端者の出身地より本変異をFH Nanaoと命名した。

3. PCR-RFLP法による発端者家系内での変異の確認

図13に発端者の家系図とPCR-RFLP法による変異の確認の結果を示した。両親に血族結婚はなく本変異は父親由来であり、発端者および父親は遺伝子上本変異のヘテロ接合体であると確認された。また母親は本変異を有しないことが確認された。

4. 同変異での血清脂質値および臨床像の検討

発端者の血清脂質値はTC 500mg/dl、その父親はTC 289mg/dl、母親はTC 224mg/dlであることと、黄色腫の程度から、発端者は臨床的にホモ接合体性FHと診断されていた。しかし発端者は遺伝子上ヘテロ接合体であり、臨床像と併せて複合型ヘテロ接合体と考えられ、父親はヘテロ接合体であると考えられた。発端者は36才時に冠動脈造影が施行され重症三枝病変と判明し、現在月4回のLDLアフェレーシスにて治療されている。

5. 北陸地区における頻度の調査

ヘテロ接合体性FH 201症例に対しPCR-RFLP法にて遺伝子変異の頻度調査を行った結果、他に発端者と同じ石川県七尾市出身の1家系に本変異が検出された。

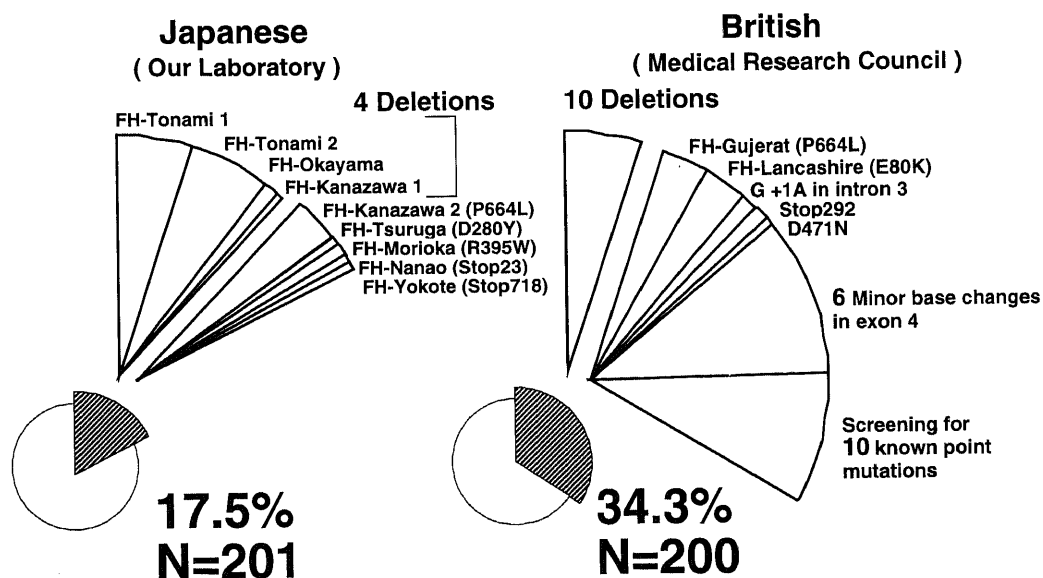


Fig. 14. Comparison of the frequencies of LDL-R gene mutations detected in our laboratory and United Kingdom. Both where similar numbers of FH patients from the single ethnic background were studied. In our laboratory 4 deletions and 5 small rearrangements in LDL-R gene account for 17.5% of FH patients from Hokuriku district of Japan. In the United Kingdom 10 deletions and 21 small rearrangements in LDL-R gene account for 34.3% of FH patients, and most frequent mutation shares only 3%.

考 察

本研究では日本人FHにおけるLDL-Rの遺伝子変異とその頻度に関する検討を行った。まず、ホモ接合体性FH 2例をそれぞれ発端者とする2家系を対象としたLDL-R遺伝子解析により、これまでに報告のない新たな遺伝子変異FH MoriokaおよびFH Yokoteを見出した。

FH MoriokaではLDL-RのEGF前駆体相同領域をコードするエクソン9内にCからTへの変異が起り395番目のArgがTrpに変異するミスセンス変異 (R395W) である。LDL-RのEGF前駆体相同領域はAリピート、BリピートおよびCリピートと呼ばれるおのおの40のアミノ酸から成る3つのシステイン (cysteine, Cys) 豊富成長因子反復領域と、BリピートとCリピートの間を占める280のアミノ酸配列から成るスペーサー領域 (spacer region) で構成される。Aリピート、BリピートおよびCリピートはそれぞれエクソン7、エクソン8およびエクソン14によりコードされ、スペーサー領域はエクソン9から13の5つエクソンにコードされる¹⁰。本変異によってスペーサー領域内の正荷電を有するArgに代わり非荷電でインドール環を有するTrpが挿入されレセプターの構造に歪みを生じると予想される。EGF前駆体相同領域は、リポ蛋白粒子がLDL-Rと結合してコーテッドベジクルとなり細胞内に取り込まれた後、エンドゾームにおいて酸依存性にLDL-Rと解離しLDL-Rが再利用される過程において不可欠と考えられている⁵⁰。本領域内の小変異により、合成された蛋白の立体構造が変化し粗面小胞体からゴルジ体への移送が障害されるか、もしくはLDL-Rの再利用が障害されると考えられる。事実これまでに報告されたスペーサー領域内でのミスセンス変異の全てが機能的クラス分類上細胞内転送障害2型もしくはレセプター再利用障害5型に分類されている³⁰。本症例のレセプター活性の結果もレセプター欠損型であり⁵⁰、LDL-Rの機能的クラス分類上細胞内転送障害、レセプター再利用障害の可能性があり、上記の推論の妥当性を示唆している。

FH Moriokaにおいて特筆すべき点は、発端者M. N.およびその妹N. N.がともに70才近くまで生存しており、ホモ接合体性FHとしては本邦のみならず、世界的にみても最高齢と思われる点である。しかも今回の検討で遺伝子レベルからもホモ接合体と確認された。

FH Moriokaホモ接合体の臨床像を、既に遺伝子変異が確定され、LDL-R活性の評価がなされているFHTsurugaおよびFHTonami-2の女性ホモ接合体と比較した。

FH TsurugaはLDL-R遺伝子のエクソン6内にGからTへの変異が起りの280番目のアミノ酸アスパラギン酸 (aspartic acid, Asp) がチロシン (tyrosine, Tyr) に変異するミスセンス変異 (D280Y) である。LDL-R活性は25%とレセプター欠損型であり重症の変異といえる³⁰。一方、FH Moriokaのレセプター活性は20%で⁵⁰ FH Tsurugaと同程度に低下しており、FH Moriokaの平均TC 694mg/dlはFH Tsurugaの平均TC 557mg/dl³⁰と比較して高値であった。FH Tonami-2はLDL-Rのイントロン1からイントロン3に及ぶ10kbの欠失によるリガンド結合部位の欠失の結果、ホモ接合体でもLDL-R活性が66%残存する変異である。このためホモ接合体性FH症例3例の平均TCが596±41mg/dlと比較的軽症であり、冠動脈病変も通常のヘテロ接合体性FH程度で比較的長寿 (平均年齢54±11才、最高齢64才女

性) であった²⁰。これに対しFH Moriokaの遺伝子変異は上述のごとくEGF前駆体相同領域にあり、著明なLDL-R活性の低下により自験ホモ接合体性FH死亡例6例 (平均死亡年齢26才) の平均TC 772±158mg/dlと同程度の高コレステロール血症を呈していた¹⁰。ホモ接合体性FH Moriokaにおける若年期のコレステロール値は不明だが、アキレス腱黄色腫の程度より持続性の高コレステロール血症は存在していたものと推測される。

したがって、ホモ接合体性FH Moriokaが2例とも長寿であった原因は、ホモ接合体性FH Tonami-2のようにLDL-R遺伝子変異によって規定されているレセプター活性および血清コレステロール値を介した機序以外に存在する可能性がある。一般に遺伝性疾患においては異常遺伝子の型がその臨床症状を規定する場合が多い。FHにおいても変異ごとの臨床像の差異を明確に示し得た報告もなされており⁵²、上述のFH Tonami-2はその典型といえる。しかしFH Moriokaにおいては、確認された遺伝子変異から予想される臨床像とは明らかに異なる長寿傾向を呈している。過去における日本の伝統的食習慣を含めた環境因子など遺伝子変異によって規定されない別の因子の関与が推測される。このような考察は遺伝子異常が同定されたからこそ可能になったのであり、遺伝子解析の臨床的意義の一つとして重要である。

FH YokoteはLDL-RのO-結合糖領域をコードするエクソン15内にCからTへの変異が起りLDL-Rの718番目のアミノ酸Glnに対応する配列が終止コドン (stop codon) に変異するナンセンス変異 (Q718X) である。LDL-RのO-結合糖領域は58のアミノ酸から成り、エクソン15のみによりコードされる¹⁰。本領域の生理学的意義は未だ明らかではない。Davisらは、O-結合糖領域の大部分が欠損したLDL-R遺伝子を人工的に作成しその発現を検討した⁵³。その結果によると機能上は正常のLDL-Rと全く等しかったという。しかし、当科で既に報告されているFH Tonami-1はイントロン14からイントロン15に及ぶ6kbを欠損した変異であり、エクソン15が欠失するためO-結合糖領域を全て欠く異常レセプターが合成されていると考えられる^{10,20}。培養細胞でLDL-Rの生合成を検討すると、正常より小さい分子量のレセプター蛋白が合成され、速やかに分解された⁵⁰。したがってO-結合糖がLDL-R蛋白の安定化に必要であることが示唆された。FH Yokoteではエクソン15の途中終止コドンが出現するためFH Tonami-1よりさらに短く不安定な細胞膜貫通領域および細胞質内の領域をも欠損した異常レセプターが合成されると考えられ、機能的クラス分類上細胞内転送障害2型に分類される可能性が高い。しかしエクソン15内のナンセンス変異はこれまでに報告がなく、細胞膜貫通領域の構造と機能の関係を明らかにする上で、FH YokoteのLDL-R活性や生合成の検討は今後重要と思われる。

発端者家系では、PCR-RFLP法により発端者、父親および弟は遺伝子上本変異のヘテロ接合体と確認され、母親は本変異を有しないことが確認された。しかし、発端者は本人とその両親のコレステロール値から臨床的にホモ接合体性FHと診断されており、弟も生後2か月の時点でのコレステロール値からホモ接合体性FHである可能性も疑われていた⁴⁷。今回の父方由来の遺伝子変異の決定により発端者は複合ヘテロ接合体と診断され、改めて母方由来の別の遺伝子変異の存在が示唆された。発端者のみならず弟もその遺伝子変異を有している可能性が残るがその解明は今後の課題である。

ホモ接合体性FHは約100万人に1人と稀ではあるが、冠動脈硬化症の発症が極めて早く、未治療の場合平均26才で心臓死を遂げる。したがってその早期診断および早期治療の見地から遺伝子診断の意義は大きい。また、特に血族結婚のないホモ接合体性FH家系から見い出された遺伝子変異は高頻度に分布している可能性が高いという意味からも、ホモ接合体性FH家系を遺伝子解析の対象とする意義は大きい。しかしFH MoriokaおよびFH Yokoteの頻度はPCR-RFLP法によるスクリーニングの結果とともに発端者家系のみで発見されたに留まり、ともに普遍的遺伝子変異 (common mutation) である可能性は否定的であった。

特定地域出身のFH25例を対象とした解析により、FH Nanaoを見い出した。FH NanaoはLDL-Rのリガンド結合領域をコードするエクソン2内にGからAへの変異が起りLDL-Rの23番目のアミノ酸Trpに対応する配列が終止コドン (stop codon) に変異するナンセンス変異(W23X)である。このように上流のエクソンにおいて早期に終止コドンが出現する変異は、正常に類似したmRNAは産生されるもののその消失が早い⁵⁰か、もしくはレセプター蛋白が産生されても極めて少量であるため、培養細胞でLDL-R蛋白が極少量のみ検出されるか、全く認められない⁵¹合成障害1型に分類されると考えられる。

発端者家系においては、PCR-RFLP法により発端者の遺伝子変異は父方由来であり、発端者はこの遺伝子変異の複合ヘテロ接合体、父親はヘテロ接合体、さらに母親は本変異を有しないことが確認された。本家系では血清総コレステロール値が母親と比較して父親でより高値であり、また発端者と父親との間のコレステロール値の大きな差が注目されていた(図13)。黄色腫の程度、冠動脈硬化症の進行度と併せて発端者は臨床的にホモ接合体性FHと考えられていたが、FH Yokoteの発端者家系と同様、今回父方由来の遺伝子変異が決定されたことから改めて母方由来の別の遺伝子変異の存在が示唆された。

FH Nanaoは米国人及びドイツ系カナダ人のFH症例に見い出されているFH Cincinnati-5と同一の遺伝子変異であるが¹⁹、それぞれの民族的、地理的背景の相違から、LDL-R遺伝子における反復変異 (recurrent mutation) と考えられる。反復変異はFHにおいて既に9種報告されている³。先に八木が報告しているFH Kanazawa-2 (P664L)³³もこの反復変異であり、Asian-Indianで発見されたFH Gujarat⁵⁰と同一の遺伝子変異であった。このP664L変異はCpGという比較的高率に遺伝子変異が発生する部位に起こっている^{48,49}。FH Nanao (W23X)の発生部位はこのCpGとは異なるがこのような反復変異が発生する部位に関する知見の蓄積は今後遺伝子変異の発生機序の解明において重要と考えられる。

1984年ヒトのLDL-R遺伝子のcDNAがクローニングされて以来、報告されたLDL-Rの遺伝子変異数は1992年の総説では150種類が挙げられるに至っている¹⁹。その多様性は当初の予想を大きく上回るものであり、その後も報告が相次ぎ、現在では200種類近くにもなっている。一方、FHにおいては孤立した環境で増加していった集団において、共通の祖先から受け継いできたであろうと考えられる数種の特定の遺伝子変異が高頻度に集積するといういわゆる創始者効果 (founder effect) が認められる場合があり^{39,40}、南アフリカ人⁵⁷⁻⁶⁰、フランス系カナダ人^{37,63-65}、フィン人が代表的である。Aalto-Setäläら⁶⁷およびKoivistoら⁶⁸⁻⁷¹によれば、フィン人ではFH HelsinkiとFH

North KareliaでFH全体の約68%を占め、さらに最近の報告ではプロモーター領域の変異を含めてさらに12の変異が決定され合計82%が説明されている。

日本人はほぼ単一の民族で構成されており、長期間にわたって外国から孤立した環境にあったという背景から、日本人FHには、創始者効果が存在する可能性も考えられ、高頻度に分布する普遍的遺伝子変異の存在の有無に関心が持たれていた。今回の能登地区での検討は日本国内でさらに地域を限定してこの創始者効果の有無を検討したものであるが、FH Nanaoは血縁のないFH合計201例のうち発端者家系を含めて2家系発見されたのみであり、普遍的遺伝子変異である可能性は低いと考えられた。またPCR-SSCP法における異常構成体に限っても、対象25例中には高頻度に認められるものは存在しなかった。これまでわれわれが報告した変異に今回決定されたFH Morioka, FH YokoteおよびFH Nanaoを追加した合計9変異により北陸地区FHの17.5%は遺伝子レベルで説明可能となったが(表5)、日本人FHにおいては普遍的遺伝子変異の存在は否定的と考えられ、遺伝子変異の多様性が示唆された。また本研究において発端者となった3例のホモ接合体性FHのうち2例が複合ヘテロ接合体であったことも日本人FHにおけるLDL-R遺伝子変異の多様性を支持すると思われる。

われわれと同様に同一の民族的背景を持つ集団を対象とし、サザンブロット法およびPCR-SSCP法、直接塩基配列決定法を用いてFHの遺伝子変異の解析およびその頻度の検討を行っている英国の施設の結果と比較した^{72,73}(図14)。ほぼ同数の母集団に対して、遺伝子変異の数とエクソンの局在に大差は認められず、英国人においては10の比較的大きな欠失と21の点変異とを合わせても遺伝子レベルで説明されるのは34.3%にとどまっており、LDL-R遺伝子変異の多様性は日本人と比較して更に明白である。したがって日本人や英国人のような創始者効果が存在しない地域におけるFHの遺伝子診断には、イントロンやプロモーター領域など未検討の領域を含め更なる解析と結果の蓄積が必要であろう。

ヘテロ接合体性FHの頻度は創始者効果が存在しなければ世界のほとんどの地域で約500人に1人と考えられており³⁹、最も頻度の高い遺伝性疾患の一つである。FHはヘテロ接合体といえども幼少時より高コレステロール血症を持続するため、早発性冠動脈硬化症を高率に発症する。さらに近年ではHMG-CoA還元酵素阻害剤の実用化により冠動脈硬化症発症前より効果的な治療が可能となった³。これらの意味からもヘテロ接合体性FHを早期から確診するための遺伝子解析の意義は大きい。またFHという一つの疾患概念の中で、個々の家系、或るいは個々の症例が示す臨床症状の多様性が遺伝子レベルで規定されていることが明らかとなれば、それに基づいた病態の把握、更には治療法の選択へと可能性が開かれ、遺伝子解析の意義は更に高いものとなって行くであろう。

結 論

日本人FHにおけるLDL-R遺伝子変異とその頻度をPCR-SSCP法、直接塩基配列決定法およびPCR-RFLP法により検討し以下の結果を得た。

1. ホモ接合体性FHを発端者とした1家系において、LDL-RのEGF前駆体相同領域をコードするエクソン9の395番目のアミノ酸Argに対応する配列CGGがTrpに対応する配列TGGへ

と変化する新変異 (R395W) を見だし FH Morioka と命名した。発端者およびその妹はともに本変異のホモ接合体であったが、ホモ接合体性 FH としては異例の長寿であった。その機序は遺伝子変異の型やレセプター活性では説明できず、遺伝子変異で規定され得ない因子によると推定された。

2. またホモ接合体性 FH を発端者とした別の 1 家系において、LDLR の O-結合糖領域をコードするエクソン 15 の 718 番目のアミノ酸 Gln に対応する配列 CAG が終止コドンに対応する配列 TAG へと変化する新変異 (Q718X) を見だし FH Yokote と命名した。

3. 特定地域における FH25 例の遺伝子解析において LDLR のリガンド結合領域をコードするエクソン 2 の 23 番目のアミノ酸 Trp に対応する配列 TGG が終止コドンに対応する配列 TAG へと変化する変異 (W23X) を見だし FH Nanao と命名した。本変異は米国人およびドイツ系カナダ人から発見されたものと同じの変異であるが、民族的背景の相違から反復変異 (recurrent mutation) と考えられた。

4. これら 3 つの新しい変異を含めた合計 9 つの遺伝子変異により北陸地区 FH の 17.5% が説明されたが、これら 3 つはいずれも出現頻度が低く、特定地域内に特定の遺伝子変異が高頻度に集積する可能性は否定的であった。以上の結果は日本人 FH における遺伝子変異の多様性を示唆すると考えられた。

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医学科内科学第二講座の八木邦公博士、稲津明広博士、梶波康二博士ならびに小泉順二助教授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医学部医学科内科学第二講座第一研究室の各位、ならびに高分子 DNA の採取に際し御協力を頂いた山本幸夫氏、見砂知子氏に感謝いたします。また、貴重な症例を御紹介頂いた丸浜喜亮先生、向井田英明先生 (岩手医科大学第一内科)、渡辺 一先生 (平鹿総合病院第二内科)、堀田祐紀先生、田口富雄先生 (恵寿総合病院循環器内科) に感謝いたします。

本研究の一部は第 26 回日本動脈硬化学会総会 (平成 6 年 6 月 9-10 日) 平成 7 年度日本動脈硬化学会冬季大会ワークショップ (平成 7 年 11 月 24-25 日) および第 28 回日本動脈硬化学会総会 (平成 8 年 6 月 13-14 日) において発表した。

文 献

- 1) Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel II). *JAMA*, 269: 3015-3023, 1993
- 2) Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, Macfarlane PW, McKillop JH & Packard CJ, for the West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med*: 333 1301-1307, 1995
- 3) 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
- 4) 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

- 5) Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Register Group. Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *BMJ* 303: 893-896, 1991
- 6) Goldstein JL, Brown MS. Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation* 76: 504-507, 1987
- 7) Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann Rev Biochem* 46: 897-930 1977
- 8) 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
- 9) Mabuchi H, Tatami R, Ueda K, Ueda R, Haba T, Kametani T, Watanabe A, Wakasugi T, Itoh S, Koizumi J, Ohta M, Miyamoto S, Takeda R. Serum lipid and lipoprotein levels in Japanese patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 32: 435-444, 1979
- 10) 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
- 11) Lindgren V, Luskey KL, Russell DW, Francke U. Human genes involved in cholesterol metabolism: Chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8567-8571, 1985
- 12) Südhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW. The LDL receptor gene: A mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 228: 815-822, 1985
- 13) Südhof TC, Russell DW, Goldstein JL, Brown MS. Cassette of eight exons shared by genes for LDL receptor and EGF precursor. *Science* 228: 893-895, 1985
- 14) Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, Russell D W. The human LDL receptor: A cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 39: 27-38, 1984
- 15) Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Human Mutation* 1: 445-466, 1992
- 16) Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ, Wilson JM. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia. *Nature Genetics* 6: 335-341, 1994
- 17) Southern E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517, 1975
- 18) 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 N Y*

Acad Sci 598: 393-397, 1990

- 19) Kajinami K, Mabuchi H, Itoh 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
- 20) 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
- 21) Kajinami K, Fujita H, Koizumi J, Mabuchi H, Takeda R, Ohta M. Genetically determined mild type of familial hypercholesterolemia including normocholesterolemic patients: FH-Tonami-2. *Circulation* 80 (suppl ID): 278, 1991
- 22) Kajinami K, Mabuchi H, Inazu A, Fujita H, Koizumi J, Takeda R, Matue T, Kibata M. Novel gene mutations at the low density lipoprotein receptor locus: FH-Kanazawa and FH-Okayama. *J Intern Med* 227: 247-251, 1990
- 23) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770, 1989
- 24) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879, 1989
- 25) 林 健志. PCR-SSCP: DNA塩基配列変化の新しい検出法. 代謝 27 (増刊号): 221-226, 1990
- 26) 林 健志. PCR-SSCP法によるAlu反復配列多型の解析. 実験医学 8: 1042-1047, 1990
- 27) 林 健志. PCRを利用した癌遺伝子活性化の検出. 実験医学 8: 1133-1136, 1990
- 28) Engelke DR, Hoener PA, Collins FS. Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 544-548, 1988
- 29) Higuchi R, von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA. DNA typing from single hairs. *Nature* 332: 543-546, 1988
- 30) Ballabio A, Gibbs RA, Caskey CT. PCR tests for cystic fibrosis detection. *Nature* 343: 220, 1990
- 31) Sarkar G, Cassady J, Bottema C, Sommer S. Characterization of polymerase chain reaction amplification of specific alleles. *Anal Biochem* 186: 64-68, 1990
- 32) Sorscher EJ, Huang Z. Diagnosis of genetic disease by primer-specified restriction map modification, with application to cystic fibrosis and retinitis pigmentosa. *Lancet* 337: 1115-1118: 1991
- 33) 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
- 34) Wang T, Okano Y, Eisensmith RC, Harvey ML, Lo WHY, Huang SZ, Zeng YT, Yuan LF, Furuyama J, Oura T, Sommer SS, Woo SLC. Founder effect of a prevalent phenylketonuria mutation in the oriental population. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2146-2150, 1991
- 35) 馬淵 宏, 多々見良三, 上田幸生, 上田良成, 羽場利博, 亀谷富夫, 伊藤清吾, 小泉順二, 宮元 進, 太田正之, 竹田亮祐, 竹越忠美. 日本人の家族性高コレステロール血症の診断基準について. 日老医誌 14: 475-479, 1977
- 36) 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
- 37) Leitersdorf E, Tobin EJ, Davignon J, Hobbs HH. Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population. *J Clin Invest* 85: 1014-1023, 1990
- 38) Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites- a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett* 22: 1859-1862, 1982
- 39) Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166, 1986
- 40) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA* 74: 5463-5467, 1977
- 41) Havel RJ, Eder HJ, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 34: 1345-1353, 1955
- 42) Allain CC, Poon LS, Chan SG, Richmond CW, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20: 470-475, 1974
- 43) Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 19: 476-482, 1973
- 44) Irish GR, Barrantes DM, Ledue TB. Immunoturbidimetry of apolipoprotein B in human serum. *Clin Chem* 33: 1267, 1968
- 45) Bursterin M, Scholnich HR. Lipoprotein-polyanionmetal interactions. *Adv Lipid Res* 11: 67-108, 1973
- 46) Friedewald WT, Levy RI, Frederickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502: 1972
- 47) Kwiterovich Jr. PO, Robert IL, Frederickson DS. Neonatal diagnosis of familial type-II hypercholesterolemia. *Lancet* i: 118-121, 1973
- 48) Youssoufian H, Antonarakis SE, Bell W, Griffin AM, Kazazian Jr. HH. Nonsense and missense mutations in hemophilia A: estimate of the relative mutation rate at CpG dinucleotides. *Am J Hum Genet* 42: 718-725, 1988
- 49) Markert ML, Norby-Slycord C, Ward FE. A high proportion of DNA point mutations associated with a specific alanine-to-valine substitution. *Am J Hum Genet* 45: 354-361, 1989
- 50) Davis CG, Goldstein JL, Sudhof TC, Anderson RGW, Russel DW, Brown MS. Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology domain. *Nature* 360: 760-765, 1987
- 51) 藤田 一. 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生合成に関する研究. 十全医会誌 99: 302-314, 1990
- 52) Moorjani S, Roy M, Torres A, Betard C, Gagne C, Lambert M, Brun D, Davignon J, Lupien P. Mutations of low-density-lipoprotein-receptor gene, variation in plasma cholesterol, and

- expression of coronary heart disease in homozygous familial hypercholesterolemia. *Lancet* 341: 1303-1306, 1993
- 53) Davis CG, Elhammer A, Russel DW, Schneider WJ, Kornfeld S, Brown MS, Goldstein JL. Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts. *J Biol Chem* 261: 2828-2838, 1986
 - 54) Trecartin RF, Liebhaber SA, Chang JC, Furbetta M, Angius A, Cao A. β -Thalassemia in Sardinia is caused by a nonsense mutation. *J Clin Invest* 68: 1012-1017, 1981
 - 55) Hobbs HH, Leitersdorf E, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW. Multiple crm-mutations in familial hypercholesterolemia: Evidence for 13 alleles, including four deletions. *J Clin Invest* 81: 909-917, 1988
 - 56) King-Underwood L, Gudnason V, Humphries S, Seed M, Patel D, Knight B, Soutar A. Identification of the 664 proline mutation in the low density lipoprotein receptor in four unrelated patients with familial hypercholesterolemia in the UK. *Clin Genet* 40: 17-28, 1991
 - 57) Van Der Westhuyzen DR, Coetzee GA, Demasius IPC, Harley EH, Gevers W, Baker SG, Seftel HC. Low density lipoprotein receptor mutations in South African homozygous familial hypercholesterolemic patients. *Arteriosclerosis* 4: 238-247, 1984
 - 58) Fourie AM, Coetzee GA, Gevers W, Van Der Westhuyzen DR. Two mutant low-density-lipoprotein receptors in Afrikaners slowly processed to surface forms exhibiting rapid degradation or functional heterogeneity. *Biochem J* 255: 411-415, 1988
 - 59) Kotze MJ, Warnich L, Langenhoven E, du Plessis L, Retief AE. The molecular basis and diagnosis of familial hypercholesterolemia in South African Afrikaners. *Ann. Hum. Genet* 55: 115-121, 1991
 - 60) Kotze MJ, Langenhoven E, Warnich L, du Plessis L, Marx MP, Oosthuizen CJJ, Retief AE. The identification of two low-density receptor gene mutations in South African familial hypercholesterolemia. *S Afr Med J* 76: 399-401, 1989
 - 61) Leitersdorf E, Van Der Westhuyzen DR, Coetzee GA, Hobbs HH. Two common low density lipoprotein receptor gene mutations cause familial hypercholesterolemia in Afrikaners. *J Clin Invest* 84: 954-961, 1989
 - 62) Van Roggen FG, Van Der Westhuyzen DR, Marais AD, Gevers W, Coetzee GA. Low density lipoprotein receptor founder mutations in Afrikaner familial hypercholesterolemic patients. *Hum Genet* 88: 204-208, 1991
 - 63) Hobbs HH, Brown MS, Russell DW, Davignon J, Goldstein JL. Deletion in the gene for the LDL receptor in majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 317: 734-737, 1987
 - 64) Leitersdorf E, Hobbs HH, Fourie AM, Jacobs M, Van Der Westhuyzen DR, Coetzee GA. Deletion in the first cysteine-rich repeat of low density lipoprotein receptor impairs its transport but not lipoprotein binding in fibroblasts from a subject with familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7912-7916, 1988
 - 65) Ma Y, Betard C, Roy M, Davignon J, Kessling AM. Identification of a second "French Canadian" LDL receptor gene deletion and development of a rapid method to detect both deletions. *Clin Genet* 36: 219-228, 1989
 - 66) Moorjani S, Roy M, Gagne C, Davignon J, Brun D, Toussaint M, Lambert M, Campeau L, Blachman S, Lupien P. Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Quebec province. *Arteriosclerosis* 9: 211-216, 1989
 - 67) Aalto-Setälä K, Koivisto U-M, Miettinen TA, Gylling H, Kesäniemi YA, Pyörälä K, Ebeling T, Mononen I, Turtola H, Viikari J, Kontula K. Prevalence and geographical distribution of major LDL receptor gene rearrangements in Finland. *J Intern Med* 231: 227-234, 1992
 - 68) Koivisto U-M, Turtola H, Aalto-Setälä K, Top B, Frants RR, Kovanen PT, Syvänen AC, Kontula K. The familial hypercholesterolemia (FH) -north Karelia mutation of the low density receptor gene deletes seven nucleotides of exon 6 and is a common cause of FH in Finland. *J Clin Invest* 90: 219-228, 1992
 - 69) Koivisto U-M, Palvimäki JJ, Janne OA, Kontula K. A Single-base substitution in the proximal Sp1 site of the human low density lipoprotein receptor promoter as a cause of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10526-10530, 1994
 - 70) Koivisto PVI, Koivisto U-M, Kovanen PT, Gylling H, Miettinen TA, Kontula K. Deletion of exon 15 of the LDL receptor gene is associated with a mild form of familial hypercholesterolemia. (FH-Espoo) *Arterioscler Thromb* 13: 1680-1688, 1993
 - 71) Koivisto U-M, Viikari JS, Kontula K. Molecular characterization of minor gene rearrangements in Finnish patients with heterozygous familial hypercholesterolemia: Identification of two common missense mutations (Gly 823 → Asp and Leu 380 → His) and eight rare mutations of the LDL receptor gene. *Am J Hum Genet* 57: 789-797, 1995
 - 72) Sun X-M, Webb JC, Gudnason V, Humphries S, Seed M, Thompson GR, Knight BL, Soutar AK. Characterization of deletions in the LDL receptor gene in patients with familial hypercholesterolemia in the United Kingdom. *Arterioscler Thromb* 12: 762-770, 1992
 - 73) Webb JC, Sun X-M, McCarthy SN, Neuwirth C, Thompson GR, Knight BL, Soutar AK. Characterization of mutations in the low density lipoprotein (LDL)-receptor gene in patients with homozygous familial hypercholesterolemia, and frequency of these mutations in FH patients in the United Kingdom. *J Lipid Res* 37: 368-381, 1996

Identification of Novel Low-Density Lipoprotein Receptor Gene Mutations and their Frequencies in Japanese Patients with Familial Hypercholesterolemia Toshinori Higashikata, Department of Internal Medicine (II) School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J. J. J. Med Soc., **106**, 257 — 275 (1997)

Key words familial hypercholesterolemia, low-density lipoprotein receptor, gene mutation, genetic epidemiology

Abstract

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant disease, clinically characterized by increased levels of plasma cholesterol, tendon xanthoma and premature coronary artery disease. FH is caused by various mutations of the low-density lipoprotein receptor (LDL-R) gene. It has not been established whether there is a common mutation of LDL-R gene in Japanese FH patients, and this study was performed to examine the existence of common LDL-R gene mutation. Firstly, two unrelated homozygous FH patients and their family members were studied. Secondly, twenty-five FH patients originating from one small selected area (Noto, Ishikawa Prefecture) were studied to find a common mutation in the area. All 18 exons of the LDL-R gene were amplified by PCR and variant conformers were detected by PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). Subsequent direct sequencing of the PCR products confirmed their mutations. Screening studies of the identified mutations among 201 unrelated heterozygous FH patients were performed through PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Thereby, two novel point mutations in the LDL-R gene were identified from each of two homozygous FH patients; one was a C-to-T mutation in the exon 9, resulting in amino acid substitution of Arg to Trp at the codon 395 (R395W), and the other was a G-to-A mutation in the exon 15, resulting in amino acid substitution of Gln to stop codon at the codon 718 (Q718X). These mutations were named FH Morioka and FH Yokote, respectively, after the districts where their probands originated. Although homozygous patients with FH Morioka showed decreased LDL-R activity and a high plasma cholesterol level as do other classical homozygous FH patients, they showed a tendency to relative longevity possibly by some environmental factors. Among the twenty-five patients originating from Noto, a novel G-to-A mutation in the exon 2 was identified, resulting in amino acid substitution of Trp to stop codon at the codon 23 (W23X). This mutation was named FH Nanao. Although FH Nanao had the same nucleotide substitution as the mutation identified in Americans and German Canadians (FH Cincinnati-5), these were thought to be a recurrent mutation of the LDL-R gene because of the differences in their ethnic backgrounds. Through the screening studies of these three mutations, one family with FH Nanao was identified, but no families with FH Morioka and FH Yokote were found. These results suggested that the LDL-R gene mutations were highly heterogeneous in Japanese FH patients, and that a common mutation of the LDL-R gene was unlikely to exist.