

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591041

研究課題名(和文) 家族性高コレステロール血症の新規原因遺伝子が臨床像と生命予後に与える影響

研究課題名(英文) Impact of novel causal gene mutation of familial hypercholesterolemia on its clinical features and prognosis

研究代表者

川尻 剛照 (KAWASHIRI, MASAOKI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：90345637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：PCSK9はLDL受容体分解を促進し、その機能亢進型変異は家族性高コレステロール血症(FH)の原因となる。われわれが見出したE32K変異を導入したHepG2細胞は野生型に比しPCSK9を39%過剰に分泌し機能亢進変異と考えられた。LDL受容体変異にPCSK9E32K変異を合併した症例を9例見出したが、そのLDLコレステロール値は195から581mg/dLと広く分布し、重症例は著明な腱黄色腫を合併しホモFH類似の病態を呈していた。FHの臨床像の重症化には何らかの追加の遺伝的因子の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A gain-of-function mutation of proprotein convertase subtilisin/kexin type9 (PCSK9) gene results in familial hypercholesterolemia (FH) through degeneration of hepatic low-density lipoprotein (LDL) receptor. PCSK9 E32K is considered as gain-of-function mutation because HepG2 cells transiently transfected PCSK9 E32K plasmid secretes 139% of PCSK9 protein compared with wild type. We found 9 patients with double heterozygous of LDL receptor gene mutation and PCSK9 E32K mutation, and their LDL-cholesterol levels ranged from 195 to 581 mg/dL. The most severe case was accompanied with large tendon xanthoma resembling homozygous FH as well as extreme hypercholesterolemia. These findings suggest that some additive hereditary factors are needed to exacerbate clinical features of PCSK9 E32K carriers.

研究分野：脂質代謝

キーワード：家族性高コレステロール血症 PCSK9 LDLコレステロール

## 1. 研究開始当初の背景

家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia : FH) は、LDL 受容体遺伝子変異を主な原因とする常染色体優性遺伝疾患である。FH のコレステロール値の分布は幅広く、LDL 受容体変異以外の何らかの因子により規定されていると推測される。

PCSK9 は LDL 受容体の細胞内分解に関与する分子で、その機能亢進型遺伝子変異は FH の新たな原因として注目されている (Nat Genet. 2003;34:154-6)。一方、機能低下型遺伝子変異は低コレステロール血症の原因となることから (Nat Genet. 2005;37:161-5)、PCSK9 はコレステロール代謝の key regulator と考えられ、コレステロール低下剤創薬の重要なターゲットと考えられている (Curr Opin Lipiol. 2007;18:650-5)。

われわれは、PCSK9 遺伝子の機能亢進型高頻度変異 E32K を見出し、同変異の LDL コレステロール値は LDL 受容体変異による FH と正常者の中間に分布することを報告した (Noguchi T Atherosclerosis 2010)。

PCSK9 には、多くの遺伝子変異の存在が示唆されている。われわれは LDL 受容体遺伝子変異を認めない FH を対象に、アミノ酸変異を伴う PCSK9 遺伝子変異を既に 8 つ見出したが、いずれも明らかな優性遺伝形式を呈する高コレステロール血症を説明困難であった。PCSK9 変異症は LDL 受容体変異症と比較し臨床像が軽症であることから、たとえ PCSK9 遺伝子変異を見出したとしても、疾患起因性の特定には機能解析が必須である。これまで、申請者らを含み *in vitro* で遺伝子導入した培養細胞の mRNA レベルや蛋白発現量により、その機能を類推してきた。

## 2. 研究の目的

PCSK9 遺伝子の新たな疾患起因性変異の発見し、*in vitro* および *in vivo* で機能解析を行い、発見された変異の臨床的意義、特に動脈硬化に与える影響を検討すること。

## 3. 研究の方法

### [ PCSK9 遺伝子解析 ]

臨床的に FH と診断される症例を対象に、当研究室で確立した HRM 法、MPLA 法で PCSK9 遺伝子解析を行った。新規遺伝子変異の場合、直接塩基配列決定法で変異を確認する。

[ LDL 受容体遺伝子と PCSK9 遺伝子変異のダブルヘテロ接合体の臨床像の検討 ]

LDL 受容体変異を合併することで、PCSK9 遺伝子変異の脂質像や動脈硬化合併症、身体所見などの臨床的特徴が強調されると予測される。かかる症例につき、生命予後も含め検討を行う。

### [ *in vitro* PCSK9 機能解析 ]

プラスミド pCMV-PCSK9-FLAG に「変異 PCSK9 遺伝子」を挿入し、HepG2 細胞に一

過性発現させ、24 時間培養後の培養液中 PCSK9 濃度を測定する。野生型 PCSK9 遺伝子導入プラスミドとの相対値により機能を同定する。

## 4. 研究成果

### [ PCSK9 遺伝子解析 ]

臨床的に FH と診断される症例を対象に、PCSK9 遺伝子解析を行った結果、既知の PCSK9E32K 変異のホモ接合体 2 例と 9 例の LDL 受容体遺伝子変異と PCSK9 遺伝子 E32K 変異のダブルヘテロ接合体を見出した。しかしながら、E32K 変異以外の PCSK9 遺伝子変異を見出すことは出来なかった。以下に LDL 受容体遺伝子変異と脂質像、臨床像を示す。

症例 1 : 3 歳男児 (C183S 変異)

LDL-C 581mg/dL、皮膚黄色腫あり

症例 2 : 33 歳男性 (C292X 変異)

LDL-C 425mg/dL、アキレス腱厚 32mm

症例 3 : 45 歳男性 (IVS15-3C/A 変異)

LDL-C 416mg/dL、アキレス腱厚 16mm

症例 4 : 62 歳女性 (K790X 変異)

LDL-C 395mg/dL、アキレス腱厚 13mm

症例 5 : 1 歳男児 (K790X 変異)

LDL-C 249mg/dL、

症例 6 : 12 歳女児 (K790X 変異)

LDL-C 223mg/dL

症例 7 : 40 歳男性 (IVS15-3C/A 変異)

TC 302mg/dL

症例 8 : 1 歳男児 (C183S 変異)

LDL-C 227mg/dL

症例 9 : 13 歳男児 (K790X 変異)

LDL-C 195mg/dL

症例 1 と 2 の LDL-C 値は著明高値で皮膚黄色腫や重症腱黄色腫を認めることより、FH ホモ接合体類似の病態を呈していた。一方、症例 8 と 9 は典型的 FH ヘテロ接合体の臨床像を呈していた。これらの知見は、PCSK9E32K 変異単独の症例の LDL-C 値の分布が、LDL 受容体変異症と正常者の中間に位置することと符合した (Noguchi T Atherosclerosis 2010)。PCSK9E32K 変異は FH の臨床像を増悪させるが、重症化には何らかの追加の遺伝的因子が存在する可能性が示唆された。多くが若年者であり、顕性化した動脈硬化を呈する症例は認めず、したがって生命予後への影響は明確にできなかった。

### [ *in vitro* PCSK9 機能解析 ]

PCSK9E32K 遺伝子を HepG2 細胞に導入後、培養液中の PCSK9 濃度を測定した。その結果、野生型に比し PCSK9 濃度は 39% 上昇していた。

## 5. 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] (計 39 件)

1. Sakata K, Kawashiri M (3 人中 番目) Expansion of the clinical application of optical coherence tomography to

- percutaneous coronary intervention and assessment of the instability of coronary atherosclerosis. *Circ J.* 79(2015):513-4. 査読有 doi: 10.1253/circj.CJ-15-0103.
2. Tada H , Kawashiri M ( 13 人中 番目 ) Assessment of coronary atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia by coronary computed tomography angiography. *Am J Cardiol.* 115(2015):724-9. 査読有 doi: 10.1016/j.amjcard.2014.12.034.
  3. Tada H , Kawashiri M ( 7 人中 番目 ) Autosomal recessive hypercholesterolemia: a mild phenotype of familial hypercholesterolemia: insight from the kinetic study using stable isotope and animal studies. *J Atheroscler Thromb.* 22(2015):1-9. 査読有 doi: 10.5551/jat.27227.
  4. Nomura H , Kawashiri M ( 13 人中 番目 ) Fragmented QRS predicts heart failure progression in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ J.* 79(2015):136-43. 査読有 doi: 10.1253/circj.CJ-14-0822.
  5. Tada H , Kawashiri M ( 6 人中 番目 ) Marked transient hypercholesterolemia caused by low-dose mitotane as adjuvant chemotherapy for adrenocortical carcinoma. *J Atheroscler Thromb.* 21(2014):1326-9. 査読有 doi:http://doi.org/10.5551/jat.27557
  6. Kawashiri M ( 4 人中 番目 ) Can next-generation sequencing replace sanger sequencing for screening genetic variants? *Circ J.* 79(2014):136-43. 査読有 doi: 10.1253/circj.CJ-14-0822.
  7. Hodatsu A , Kawashiri M ( 6 人中 番目 ) Compound heterozygosity deteriorates phenotypes of hypertrophic cardiomyopathy with founder MYBPC3 mutation: evidence from patients and zebrafish models. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 307(2014):H1594-604. 査読有 doi: 10.1152/ajpheart.00637.2013.
  8. Mabuchi H Noguchi T ( 16 人中 番目 ) , Kawashiri M ( 同 番目 ) Genotypic and phenotypic features in homozygous familial hypercholesterolemia caused by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) gain-of-function mutation. *Atherosclerosis.* 236(2014):54-61. 査読有 doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.06.005.
  9. Nohara A , Kawashiri M ( 8 人中 番目 ) Clinical significance of measuring soluble LR11, a circulating marker of atherosclerosis and HbA1c in familial hypercholesterolemia. *Clin Biochem.* 47(2014):1326-8. 査読有 doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.05.003.
  10. Kawashiri M ( 22 人中 番目 ) Impact of lesion morphology and associated procedures for left main coronary stenting on angiographic outcome after intervention: sub-analysis of Heart Research Group of Kanazawa, HERZ, Study. *Cardiovasc Interv Ther.* 2014 Apr;29(2):117-22. 査読有 doi: 10.1007/s12928-013-0222-8.
  11. Kawashiri M ( 7 人中 番目 ) Erdheim-Chester disease involving the brain and the heart. *J Am Coll Cardiol.* 2014 Mar 25;63(11):1121. 査読有 doi: 10.1016/j.jacc.2013.11.047.
  12. Kawashiri M ( 6 人中 番目 ) Current perspectives in genetic cardiovascular disorders: from basic to clinical aspects. *Heart Vessels.* 2014 Mar;29(2):129-41. 査読有 doi: 10.1007/s00380-013-0391-5.
  13. Fujita T , Kawashiri M ( 18 人中 番目 ) Sarcomere gene mutations are associated with increased cardiovascular events in left ventricular hypertrophy: results from multicenter registration in Japan. *JACC Heart Fail.* 1(2013):459-66. 査読有 doi: 10.1016/j.jchf.2013.08.007.
  14. Kawashiri M ( 10 人中 番目 ) Impact of intensive lipid lowering on lipid profiles over time and tolerability in stable coronary artery disease: insights from a subanalysis of the coronary atherosclerosis study measuring effects of rosuvastatin using intravascular ultrasound in Japanese subjects (COSMOS). *Cardiovasc Ther.* 31(2013):335-43. 査読有 doi: 10.1111/1755-5922.12027.
  15. Yamamoto R , Kawashiri M ( 11 人中 番目 ) Anomalous origin with myocardial bridging in coronary artery: stealth images in computed tomography. *J Am Coll Cardiol.* 60(2012):2419. 査読有 doi: 10.1016/j.jacc.2012.03.085.
  16. Tada H Kawashiri M ( 15 人中 番目 ) , Noguchi T ( 同 番目 ) Post-prandial remnant lipoprotein metabolism in autosomal recessive hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest.* 42(2012):1094-9. 査読有 doi: 10.1111/j.1365-2362.2012.02700.x.

〔学会発表〕(計 40 件)

1. Nohara A, Kawashiri M et al .Impact of FMO3 gene loss-of-function variants on coronary artery disease in Japanese 87th Scientific Sessions of American Heart Association , Nov 15-19 , 2014 , McCormick Place , Chicago ( USA )
2. Nohara A , Kawashiri M et al . Genetic CETP deficiency associated with higher eGFR and lower coronary stenosis index in dyslipidemic patients in Japan 87th Scientific Sessions of American Heart Association ,Nov 15-19 , 2014 , McCormick Place , Chicago ( USA )
3. Nohara A , Kawashiri M et al . Metabolic burden switches impact of betatrophin ( ANGPTL8 ) R59W mutation from atheroprotective to atherogenic lipid profile 87th Scientific Sessions of American Heart Association , Nov 15-19 , 2014 , McCormick Place , Chicago ( USA )
4. Tada H , Kawashiri M et al . Coronary plaque burden assessed with coronary computed tomography angiography predicts future coronary events in patients with familial hypercholesterolemia 87th Scientific Sessions of American Heart Association , Nov 15-19 , 2014 , McCormick Place , Chicago ( USA )
5. Tada H , Kawashiri M et al . Abnormal lipoprotein metabolism other than LDL fraction in familial hypercholesterolemia : Serial analysis using ultracentrifugation method 87th Scientific Sessions of American Heart Association , Nov 15-19 , 2014 , McCormick Place , Chicago ( USA )
6. Tada H , Kawashiri M et al . Early coronary atherosclerotic morphology in pseudoxanthoma elasticum : Images from intravascular ultrasound and optical coherence tomography 87th Scientific Sessions of American Heart Association , Nov 15-19 , 2014 , McCormick Place , Chicago ( USA )
7. Tada H , Kawashiri M et al . Extreme hypercholesterolemia exacerbated by breast feeding : Infantile cases of sitosterolemia with novel mutations in ABCG5 gene 87th Scientific Sessions of American Heart Association ,Nov 15-19 , 2014 , McCormick Place , Chicago ( USA )
8. Nakahashi T , Kawashiri M et al . CABG clinical SYNTAX score and Euroscore as predictors of long term clinical outcomes in patients with previous coronary artery bypass grafting undergoing percutaneous coronary intervention European Society of Cardiology Annual Congress 2014 , Aug 30-Sep 3 , Fira Gran Via , Barcelona ( Spain )
9. Sakata K ,Kawashiri M et al .Impact of patient's characteristics and procedural, angiographic, and IVUS findings on neoatherosclerosis after stent implantation : Insights from an optical coherence tomography study European Society of Cardiology Annual Congress 2014 , Aug 30-Sep 3 , Fira Gran Via , Barcelona ( Spain )
10. 川尻剛照 ランチョンセミナー 冠動脈プラーク形成予防のための脂質管理の重要性 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 July 10-11, 2014 , 京王プラザホテル ( 東京都・東京 )
11. Nohara A , Kawashiri M et al .Impact of loss of function variant of betatrophin on advanced coronary artery disease among diabetic patients in Japan 82nd European Atherosclerosis Society Congress , May 31-Jun 3 , 2014 , North Convention Centre , Madrid ( Spain )
12. 川尻剛照 イブニングセミナー 冠動脈疾患予防のための脂質管理 第 25 回日本心エコー図学会学術集会 Apr 17-19 , 2014 石川県立音楽堂ほか ( 金沢、石川県 )
13. Sakata K ,Kawashiri M et al .Impact of patient's characteristics and procedural, angiographic, and IVUS findings on neoatherosclerosis after stent implantation : Insights from an optical coherence tomography study 63rd Annual Scientific Session of American College of Cardiology and i2 Summit ,Mar 29-31 ,2014 ,Washington Convention Center , Washington D.C. ( USA )
14. Suematsu T ,Kawashiri M et al .Impact of lesion morphology and associated procedures for left main coronary stenting on angiographic outcome after intervention : Subanalysis of heart research group Kanazawa , HERTZ study 63rd Annual Scientific Session of American College of Cardiology and i2 Summit ,Mar 29-31 ,2014 ,Washington Convention Center , Washington D.C. ( USA )
15. Fujita C ,Kawashiri M et al .Vulnerable coronary plaque still exist even in low LDL-C levels : Evidence from study with serial CT coronary angiography 63rd Annual Scientific Session of American College of Cardiology and i2 Summit ,Mar 29-31 ,2014 ,Washington

- Convention Center , Washington D.C.  
( USA )
16. 高田睦子, 川尻剛照ほか シンポジウム  
Current status and perspective of  
female interventional cardiologists in  
community hospital 第 78 回日本循環器  
学会総会学術集会 Mar 21-23, 2014, 東京  
国際フォーラムほか ( 東京, 東京都 )
  17. 川尻剛照 シンポジウム 家族性高コレス  
テロール血症に対する LDL アフェレシ  
ス治療 日本医工学治療学会第 30 回学会  
大会 Mar 21-23, 2014, ウィンクあいち  
( 名古屋, 愛知県 )
  18. Tada H, Kawashiri M et al .Progression  
of coronary plaque burden in patients  
with familial hypercholesterolemia :  
Assessment with coronary CT 86th  
Scientific Sessions of American Heart  
Association , Nov 16-20 , 2013 , Dallas  
Convention Center , Dallas ( USA )
  19. Tada H , Kawashiri M et al . Clinical  
impact of heterozygous carrier of  
ATP-binding cassette subfamily G  
member 5 gene on asymptomatic  
normolipidemic patients : Evidence  
from familial gene analysis 86th  
Scientific Sessions of American Heart  
Association , Nov 16-20 , 2013 , Dallas  
Convention Center , Dallas ( USA )
  20. Mori M , Kawashiri M et al . Impact of  
very early endothelialization after  
Nobori stent implantation on its low  
frequency of in-stent thrombosis :  
Evidence from super acute  
examination in a porcine model 86th  
Scientific Sessions of American Heart  
Association , Nov 16-20 , 2013 , Dallas  
Convention Center , Dallas ( USA )
  21. 川尻剛照ほか シンポジウム 家族性高コ  
レステロール血症に対する LDL アフェ  
レシス治療 第 34 回日本アフェレシス学  
会学術大会 Nov 1-3 , 2013 , 軽井沢プリ  
ンスホテルウエスト ( 群馬県・軽井沢市 )
  22. Kawashiri M et al . シンポジウム  
Antisense inhibition of apolipoprotein  
B syntehsis : A promising therapeutic  
option for homozygous familial  
hypercholesterolemia 第 45 回日本動脈  
硬化学会総会・学術集会 July 18-19,  
2013 , 京王プラザホテル ( 東京都・東京 )
  23. Nohara A , Kawashiri M et al .Common  
PCSK9 E32K variant as genetic  
background of familial combined  
hyperlipidemia 81th European  
Atherosclerosis Society Congress , Jun  
2-5 , 2013 , Lyon Congress Centre ,Lyon  
( Spain )
  24. Mabuchi H , Kawashiri M et al . High  
frequency and mild phenotype in true  
homozygous or double heterozygous  
familial hypercholesterolemia caused  
by PCSK9 mutation ( E32K ) in Japan  
81th European Atherosclerosis Society  
Congress , June 2-5 , 2013 , Lyon  
Congress Centre , Lyon ( Spain )
  25. Kawashiri M et al . プレナリーセッション  
PCSK9, A marker of  
responsiveness to statin and  
atherosclerosis 第 77 回日本循環器学会  
総会・学術集会 Mar 15-17 , 2013 , パシ  
フィコ横浜 ( 神奈川県・横浜市 )
  26. Miwa K , Kawashiri M et al . In-vivo  
assessment of in-stent  
neoatherosclerosis after drug-eluting  
stent implantation - An optical  
coherence tomography study - 62th  
Annual Scientific Session of American  
College of Cardiology , Mar 9-11 , 2013 ,  
Moscone Center , San Francisco ( USA )
  27. Kawashiri M et al . Statin therapy  
improves fractional catabolic rate of  
LDL without affecting impaired VLDL  
and VLDL remnant catabolism in  
homozygous FH patients due to PCSK9  
gene mutation: Evidence from kinetic  
study with stable isotope 85th  
Scientific Sessions of American Heart  
Association ,Nov 3-7 ,2012 ,Los Angeles  
Convention Center ,Los Angeles( USA )
  28. Nohara A , Kawashiri M , et al . Impact  
of ER-stress affecting variant of XBP-1  
gene on lipids, diabetes, chronic kidney  
disease, and coronary artery disease  
85th Scientific Sessions of American  
Heart Association , Nov 3-7 , 2012 , Los  
Angeles Convention Center , Los  
Angeles ( USA )
  29. Nohara A , Kawashiri M et al .  
Triglyceride-rich high-density  
lipoprotein composition as residual risk  
biomaker of coronary artery disease  
including reduced eGFR and  
pre-diabetes 85th Scientific Sessions of  
American Heart Association , Nov 3-7 ,  
2012 , Los Angeles Convention Center ,  
Los Angeles ( USA )
  30. 川尻剛照 パネルディスカッション 長期  
予後からみた PCI 後のリスク管理「脂質  
代謝」第 28 回 CVIT 東海北陸地方会 Sep  
29 , 2012 , 金沢歌舞伎座 ( 石川県・金沢  
市 )
  31. 川尻剛照ほか 教育講演 8 マルチリスク  
管理 : その効果と展望 第 60 回日本心臓  
病学会学術集会 Sep 14-15, 2012 , ホテ  
ル日航金沢他 ( 石川県・金沢市 )
- [ 図書 ] ( 計 7 件 )
1. 川尻剛照, 池脇克則 妊娠時の家族性高  
コレステロール血症治療 ドクターサロ  
ン , 35-29 , キョーリンメディカルサプラ

- イ社, 2015 .
2. 川尻剛照 LDLRAP1・PCSK9 新 ABC 「高LDL-C血症、低HDL-C血症」,79-86 , 最新医学社, 大阪, 2015 .
  3. 川尻剛照, 山岸正和 冠攣縮性狭心症 Year Note Topics 2015-2016, 内科・外科疾患, 93-94, メディックメディア, 2015 .
  4. 川尻剛照, 山岸正和 労作性狭心症 Year Note Topics 2015-2016, 内科・外科疾患, 90-92, メディックメディア, 2015 .
  5. 川尻剛照, 山岸正和 冠攣縮性狭心症 Year Note Topics 2013-2014, 内科・外科疾患, 84-85, メディックメディア, 2013 .
  6. 川尻剛照, 山岸正和 労作性狭心症 Year Note Topics 2013-2014, 内科・外科疾患, 81-84, メディックメディア, 2013 .
  7. 川尻剛照, 今野哲雄, 林研至, 山岸正和 心筋梗塞 診療ガイドライン Up-to Date, 236-244, メディカルビュー社, 2012 .

6. 研究組織

(1)研究代表者：川尻 剛照  
( KAWASHIRI MASA AKI )

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：90345637

(2)研究分担者：野口 徹  
( NOGUCHI TOHRU )

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40456421