

脳腱黄色腫症の遺伝子解析とケノデオキシコール酸による治療効果に関する研究

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/2297/4546

脳腱黄色腫症の遺伝子解析とケノデオキシコール酸による 治療効果に関する研究

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 末 剛

脳腱黄色腫症 (cerebrotendinous xanthomatosis, CTX) は、知能低下、錐体路症状、小脳症状などの進行性神経障害、アキレス腱黄色腫および若年性白内障、若年性動脈硬化症などにより特徴づけられる常染色体劣性遺伝性疾患である。CTXは世界中で300例近い症例が報告されているが、そのうちわが国では55例が報告され比較的頻度が高いといわれている。本症は、シトクロムP-450 (cytochrome P-450, CYP) 蛋白である27-水酸化酵素 (27-hydroxylase, CYP 27) 遺伝子異常により発症し、胆汁酸合成系におけるCYP 27が欠損しているため、ケノデオキシコール酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA) の合成が行われず、コレステロールや胆汁アルコールが過剰に生成される。さらに胆汁酸プールが減少するため、コレステロール合成経路、胆汁酸合成経路の律速酵素に対するフィードバックが減少し、代謝障害はさらに助長される。本研究では、日本人CTX患者2症例のCYP 27遺伝子解析を行い、CDCAによる治療効果を検討した。対象者の末梢白血球より分離した高分子DNAを用いて、CYP 27遺伝子の全9エクソンとプロモーター領域、ポリ-Aシグナル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) 法により遺伝子変異の確認を行った。症例1において、CYP 27遺伝子のエクソン2の新変異R104Q (CGG->CAG: アルギニンからグルタミン) およびエクソン8のR441Q変異 (CGG->CAG: アルギニンからグルタミン) を見出し、本症例はR104Q変異とR441Q変異の複合型ヘテロ接合体であることが判明した。症例2において、CYP 27遺伝子のエクソン8のR441W変異 (CGG->TGG: アルギニンからトリプトファン) を見出した。今回見出した3つの点変異は、ヘム補因子に対するリガンドとして重要な領域であり、蛋白の構造変化から機能低下につながっているものと考えられた。2症例に対してCDCA (600mg/日) を投与し、4週後にその効果について検討した。血清コレステロール値、MRI所見は不変であったが、治療4週後に脳波の改善、痴呆の改善、神経症状の改善を認めた。本症に対するCDCAによる治療は、検査所見の改善以前に中枢神経系の機能的改善を認める可能性が示唆された。

Key words cerebrotendinous xanthomatosis, cholestanol, 27-hydroxylase, chenodeoxycholic acid, gene mutation

脳腱黄色腫症 (cerebrotendinous xanthomatosis, CTX) は、知能低下、錐体路症状、小脳症状などの進行性神経障害、アキレス腱黄色腫および若年性白内障、若年性動脈硬化症などにより特徴づけられる常染色体劣性遺伝性疾患である¹⁾。

1937年にvan Bogaertら²⁾により最初の症例が報告され、以後、これまで世界中で300例近い症例が報告されている。わが国では55例の報告がみられ¹⁾³⁾、CTXの頻度はわが国では比較的高いといわれている。

1968年Menkesら⁴⁾により初めて生化学的に検討され、神経組織に蓄積した脂質は、コレステロールおよびコレステロールに類似した構造を示すコレステノールであることが明らかにさ

れ、本症は先天性ステロール蓄積症であることが同定された。1970年代には、CTXでは胆汁酸組成に異常があり、とくにケノデオキシコール酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA) が著明に減少していること⁵⁾⁶⁾、また、正常ではほとんどみられない多種類の胆汁アルコールが多量に産生されていること⁷⁾が明らかになり、本症はC27-ステロール側鎖の酸化障害による胆汁酸合成障害であることが明らかにされた⁸⁾。1980年代に入り、本症ではシトクロムP-450 (cytochrome P-450, CYP) 蛋白である27-水酸化酵素 (27-hydroxylase, CYP 27) の欠損があることが報告された⁹⁾。

1991年、Caliら¹⁰⁾によりヒトCYP 27のcDNAがクローニン

平成13年11月28日受付、平成13年12月28日受理

Abbreviations : CDCA, chenodeoxycholic acid; CETP, cholesteryl ester transfer protein; CTX, cerebrotendinous xanthomatosis; CYP, cytochrome P-450; FH, familial hypercholesterolemia; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; 27-hydroxylase, CYP 27; LDL, low density

グされ、CTX患者においてCYP 27遺伝子に2種類の点変異が明らかにされた¹¹⁾。彼らは、CTX患者からの変異cDNAをCos細胞へ導入し、CYP 27蛋白は認められ、活性が非常に低下していることを報告した¹⁰⁾。また、CYP 27遺伝子は、ヒトでは染色体2のq33とqterとの間に位置するとマッピングされた¹¹⁾。その後、Leeら¹²⁾により連鎖解析が施行され、CYP 27遺伝子は染色体2のq35に位置することが明らかにされた。

CYP 27はミトコンドリア内膜に位置するシトクロムP-450であり¹³⁾、ステロイド核側鎖の酸化反応を触媒する酵素である¹⁴⁾¹⁵⁾。また、その反応は二つの蛋白、NADPH-フェレドキシン還元酵素 (NADPH-ferredoxin reductase) とフェレドキシン (ferredoxin) を補酵素として必要とする反応系である。CYP 27はN-末端に33個のアミノ酸からなるミトコンドリア・シグナルペプチドをもち¹⁶⁾、それに続く498個のアミノ酸からなる蛋白である¹⁷⁾。

図1にアセチル補酵素A (acetyl-coenzyme A) からコレステロールを経て胆汁酸が合成される経路を示す。この経路が体内からコレステロールを排泄する主要な機構である¹⁸⁾。コレステロールから7 α -水酸化酵素により、7 α -水酸化コレステロールが生成された後、コール酸とCDCAを合成する経路に分かれて胆汁酸が合成される。CTXではCYP 27の欠損により、図1に示した場所で胆汁酸合成が障害される。図1に示すようにコール酸は側鎖経路を介して合成されるが、CDCAの合成は行われず、コレスタノールや胆汁アルコールが過剰に生成されることになる。さらに胆汁酸プールが減少するため、コレステロール

合成経路の律速酵素である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) 還元酵素および胆汁酸合成経路の律速酵素である7 α -水酸化酵素に対するフィードバックが減少し、両酵素活性は亢進し、上記の代謝障害はさらに助長される。コレスタノールの生合成に関してはSalenら¹⁹⁾は放射性同位元素による二重ラベルされたメバロン酸を用い、コレステロールから生合成されることを明らかにした。しかし、本症において産生増加したコレスタノールは、7 α -水酸化酵素活性上昇により多量に産生された7 α -水酸化コレステロール、およびその中間代謝産物から主として産生されると考えられている²⁰⁾。

CTXにおける患者年齢の平均は、わが国では男性40.4歳、女性36.8歳、諸外国では男性38.5歳、女性38.6歳で男女ともにほぼ同年齢であり、30歳以上の壮年期以後の患者が77%を占めている。一方、患者の初発症状の発症年齢分布は、5~15歳にピークを認め、20歳以前の発症が86%を占めている²¹⁾。患者年齢は、すなわち病気の診断時年齢であり、本症では発症から約20~30年の経過を経て診断されている例が大多数である。早期診断がなされないと、行動異常、痴呆、錐体路症状、小脳症状、末梢神経症状、けいれんといった進行性神経障害が出現してくる²²⁾。本症ではCDCAの長期投与により、神経症状の改善ないし進行を防止することが可能であるという報告があり²³⁾、早期診断、早期治療開始がきわめて重要と思われる。そこで、本研究ではCTX患者のCYP 27遺伝子解析を行い、CDCAによる治療効果を検討した。

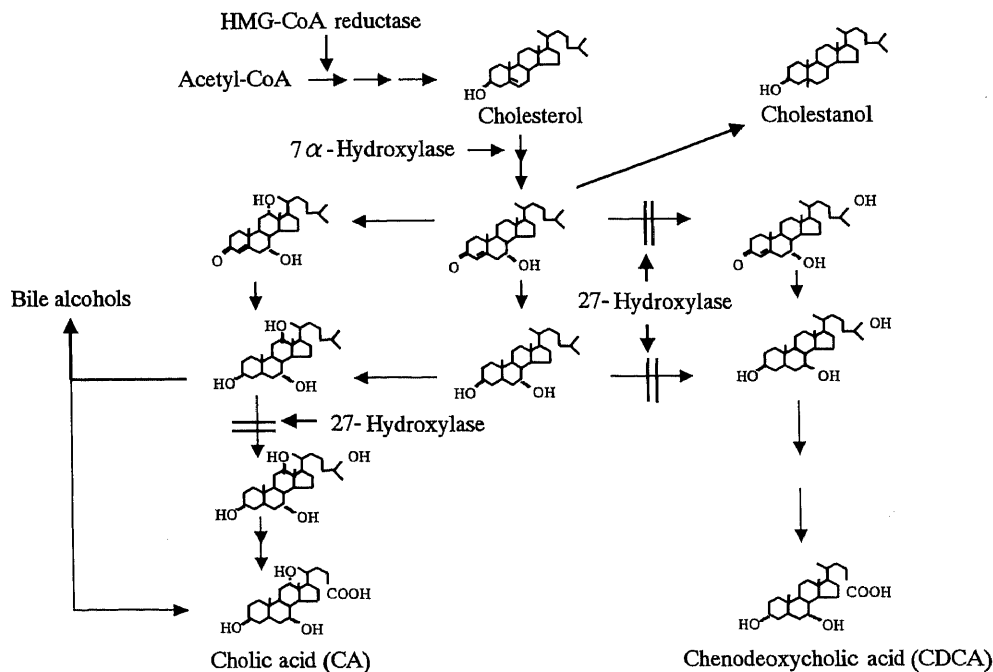


Fig. 1. Major pathway for the biosynthesis of cholic acid and chenodeoxycholic acid in humans. There is an inborn defect of 27-hydroxylase in CTX.

lipoprotein; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; MRI, magnetic resonance imaging; PCR-DGGE, PCR-denaturing gradient gel electrophoresis; PCR-RFLP, PCR-restriction fragment length polymorphism; PCR-SSCP, PCR-single strand conformational polymorphism; TC, total cholesterol; TG, triglyceride

対象および方法

I. 対 象

対象は、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講座血管分子遺伝学で、臨床的にCTXと診断された患者2症例である。

症例1; 65歳男性. 血清コレスタノール値 7.7 $\mu\text{g/ml}$ (コレス

タノール:コレステロール比 0.4%) と上昇していること, 右第IV指, 両膝, 両アキレス腱に黄色腫を認めること, 痴呆, 錐体路症状, 小脳症状を認めることより臨床的にCTXと診断された。

症例2; 67歳男性. 血清コレスタノール値 11.0 $\mu\text{g/ml}$ (コレスタノール:コレステロール比 0.7%) と上昇していること, 両手背, 両肘, 両膝, 両アキレス腱, 両足背に黄色腫を認めるこ

Table 1. Clinical data of two patients with CTX

Variable	Patient 1	Patient 2	Variable ($\mu\text{mol/l}$)	Patient 1	Patient 2
Age (year)	65	67	G-colic acid	*	*
Sex	M	M	T-colic acid	*	*
TC (mg/dl)	191	167	Colic acid	*	*
HDL-C (mg/dl)	60	26	G-chenodeoxycolic acid	*	*
TG (mg/dl)	62	124	T-chenodeoxycolic acid	*	*
LDL-R activity (%)	120	-	Chenodeoxycolic acid	*	*
CETP ($\mu\text{g/ml}$)	2.3	2.4	G-deoxycolic acid	0.5	0.5
Cholestanol ($\mu\text{g/ml}$)	7.7	11.0	T-deoxycolic acid	0.2	0.2
Sitosterol ($\mu\text{g/ml}$)	1.4	5.4	Deoxycolic acid	0.4	0.1
Cholestanol/cholesterol (%)	0.4	0.7	G-litocolic acid	*	*
G-ursodeoxycolic acid ($\mu\text{mol/l}$)	*	*	T-litocolic acid	*	*
T-ursodeoxycolic acid ($\mu\text{mol/l}$)	*	*	Litocolic acid	*	*
Ursodeoxycolic acid ($\mu\text{mol/l}$)	*	*	Total	15.6	3.5

M, male; TC, total cholesterol; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; TG, triglyceride; LDL-R, low density lipoprotein receptor; CETP, cholesteryl ester transfer protein; -, not examined; G-, Glycine-conjugated; T-, Taurine-conjugated. *Not detected. All values were obtained during pre-treatment period.

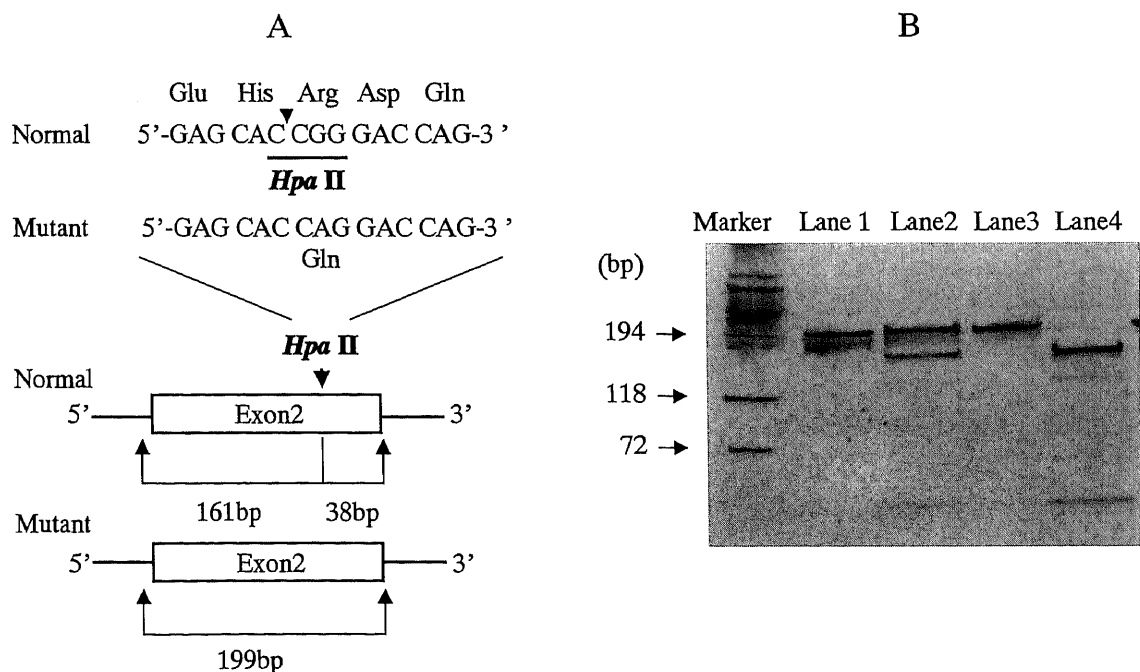


Fig. 2. (A) Rapid detection method for missense mutation (R104Q) of the exon 2 employing the mutation-mediated restriction map modification. Gene amplification by PCR introduced one *Hpa* II site in the PCR product only for the normal allele. Digestion of the PCR products with *Hpa* II generates polymorphic restriction fragments of 199 bp and/or 161 bp. Heterozygotes show double band of 199 bp and 161 bp.

(B) Patient 1 show both 199 bp and 161 bp fragment after digestion with *Hpa* II, which indicate the heterozygote for R104Q. Lane1, PCR product in patient 1; Lane2, Digestion of the PCR product with *Hpa* II in patient 1; Lane3, PCR product in normal allele; Lane4, Digestion of PCR product with *Hpa* II in normal allele; Marker, The molecular size marker of Φ -X174 double strand DNA digested with *Hae* III.

Table 2. Oligonucleotides flanking exons of the 27-hydroxylase gene for PCR amplification

Primer	Location	Amplification	Sequence 5' to 3'	PCR product size (bp)
FRup	5'-flanking	Promoter	GGTGTGGGGCTTCCCGATTT	363
FRd	Exon1	Promoter	CCTCAGCCTCGCGCAGCCCA	
E1up	5'-flanking	Exon1	ACAACCCATGGCTGCGCT	267
E1d	Intron1	Exon1	GTTACCTGTAAGTGGTGC	
E2up	Intron1	Exon2	CTCCACAGGTGCTTTACAAGG	199
E2d	Intron2	Exon2	GTGGTGAACGGCCCATAG	
E3up	Intron2	Exon3	GCTTATCTTTGTGCTGTTTCTCTGC	290
E3d	Intron3	Exon3	GAGACAACCTCTCCCTGACCCATT	
E4up	Intron3	Exon4	TCTGCCTCCTGTGATGGCCTCTGTG	295
E4d	Intron4	Exon4	GCTGATGCACAGACCTGGAGTCACC	
E5up	Intron4	Exon5	GCTCTTGGTCCTTGGAGATCATGAC	291
E5d	Intron5	Exon5	ACTGGTTACGGTTGGGAGCTGGGGG	
E6up	Intron5	Exon6	TTCTAGAAATCGCTCACCTGATCT	259
E6d	Intron6	Exon6	TTCCCTCCCCACAAAGAGATCCTGT	
E7up	Intron6	Exon7-8	GCAGACTCCAGACATTCTTTCCCT	264
E7d	Exon8	Exon7-8	TGGAAGCTTTCAGGCTCAGAGAAG	
E8up	Exon8	Exon8	CCTTCTCTGAGCCTGAAAGCTTCC	292
E8d	Intron8	Exon8	GTGGATTGTGTGTTGCCATCCACT	
E9up	Intron8	Exon9	AGTGGATGGCAAACACACAATCCAC	194
E9d	3'-flanking	Exon9	CCCAGCAAGGCGGAGACTCA	
POup	3'-flanking	poly-A	CCCTTTATCGCATTGCTGTC	103
POd	3'-flanking	Poly-A	CCCTAAGATGCTGGGTAGTCA	

Oligonucleotides complementary to DNA sequences flanking exons of human 27-hydroxylase gene were synthesized and used to amplify the intervening sequences with PCR.

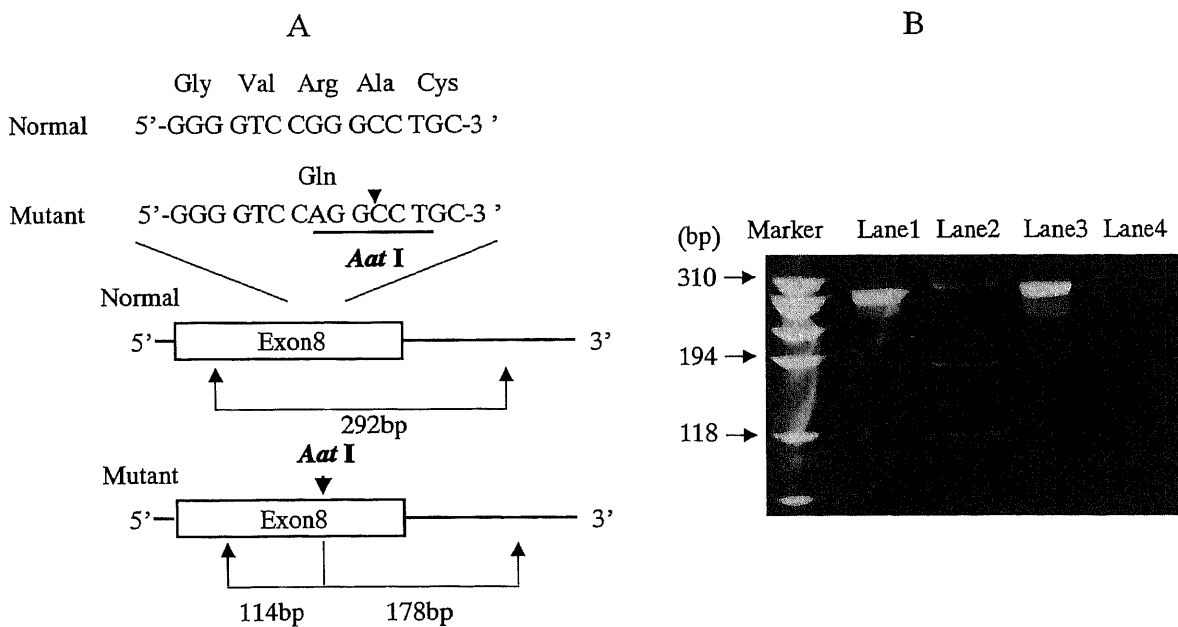


Fig. 3. (A) Rapid detection method for missense mutation (R441Q) of the exon 8 employing the mutation-mediated restriction map modification. Gene amplification by PCR introduced one *Aat* I site in the PCR product only for G to A mutated allele (R441Q). Digestion of the PCR products with *Aat* I generates polymorphic restriction fragments of 292 bp and/or 178 bp. Heterozygotes show double band of 292 bp and 178 bp.

(B) Patient 1 show both 292 bp and 178 bp fragment after digestion with *Aat* I, which indicate the heterozygote for R441Q. Lane1, PCR product in patient 1; Lane2, Digestion of the PCR product with *Aat* I in patient 1; Lane3, PCR product in normal allele; Lane4, Digestion of PCR product with *Aat* I in normal allele; Marker, The molecular size marker of ϕ -X174 double strand DNA digested with *Hae* III.

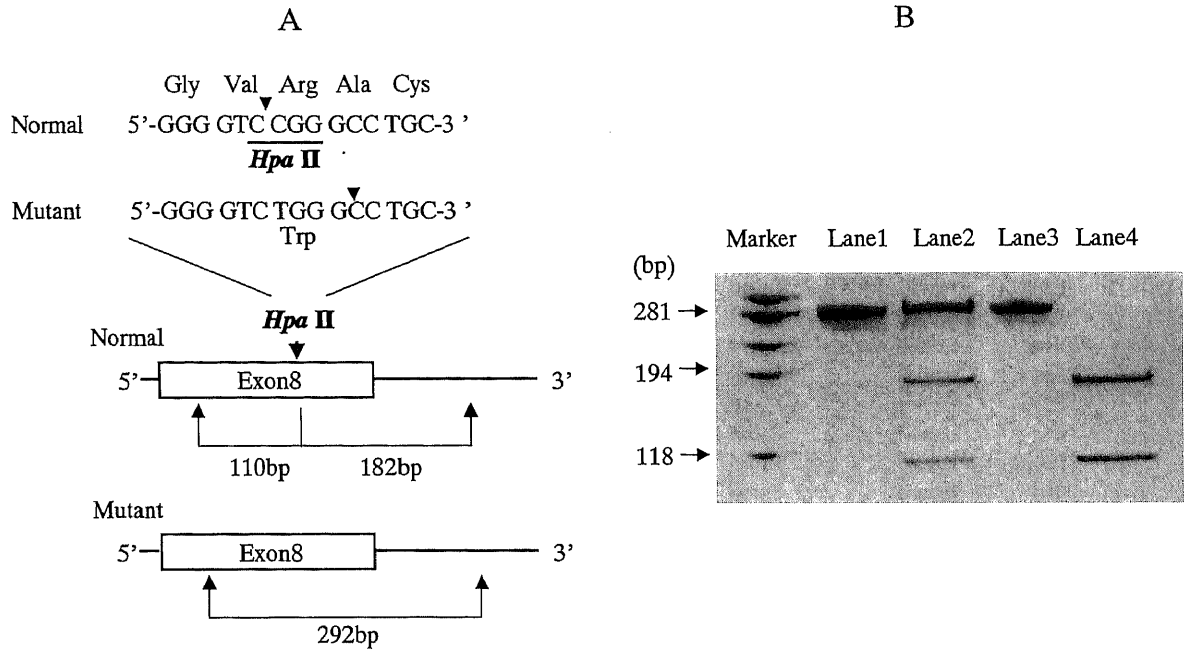


Fig. 4. (A) Rapid detection method for missense mutation (R441W) of the exon 8 employing the mutation-mediated restriction map modification. Gene amplification by PCR introduced one *Hpa* II site in the PCR product only for the normal allele. Digestion of the PCR products with *Hpa* II generates polymorphic restriction fragments of 292 bp and/or 182 bp. Heterozygotes show double band of 292 bp and 182 bp.

(B) Patient 2 show both 292 bp and 182 bp fragment after digestion with *Hpa* II, which indicate the heterozygote for R441W. Lane1, PCR product in patient 2; Lane2, Digestion of the PCR product with *Hpa* II in patient 2; Lane3, PCR product in normal allele; Lane4, Digestion of PCR product with *Hpa* II in normal allele; Marker, The molecular size marker of ϕ -X174 double strand DNA digested with *Hae* III.

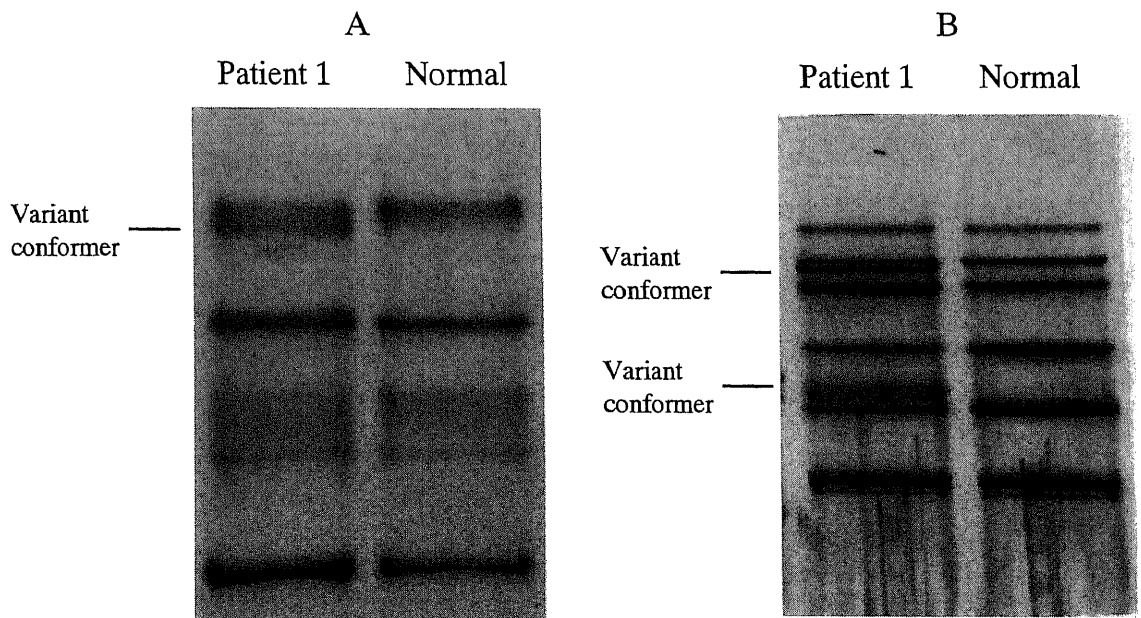


Fig. 5. PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analysis in the exon 2 and the exon 8 of 27-hydroxylase gene in patient 1. The bar along the right side indicate the wild pattern (normal). (A) PCR-SSCP analysis in the exon 2. (B) PCR-SSCP analysis in the exon 8. The patient 1 shows the mutational pattern with variant conformer in both the exon 2 and the exon 8.

と、痴呆、錐体路症状、小脳症状を認めることより臨床的にCTXと診断された。

表1に症例1と症例2の臨床データを示した。症例1の血清脂質値は総コレステロール (total cholesterol, TC) 191mg/dl, 高比重リポ蛋白コレステロール (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 60mg/dl, トリグリセライド (triglyceride, TG) 62mg/dl, 症例2の血清脂質値はTC 167mg/dl, HDL-C

26mg/dl, TG 124mg/dlと症例1は正脂血症, 症例2は低HDLコレステロール血症であった。血清コレステロール値はそれぞれ7.7 μg/ml, 11.0 μg/mlと上昇しており, コレステロールとコレステロールの比もそれぞれ0.4%, 0.7%と上昇していた。Kasamaら²⁴⁾はCTXの診断基準としてコレステロール:コレステロール比が0.3%以上であることを提唱している。血清胆汁酸抱合体分画ではCDCAはともに検出されなかった。

これらの症例の検体は既提供試料であったが, 検査に先だって十分な説明に基づく同意を得た。また, 試料を匿名化することで研究結果が提供者等に影響を与えないよう考慮した。また, 個人情報結果に全く表現されず保護されている。以上の点について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 (研究許可年月日 平成13年12月3日, 審査番号 第12号, 課題名 脳髄黄色腫症の遺伝子診断)。

II. 方法

1. 高分子DNA抽出

対象者全例から検査に先だって十分な説明に基づく同意を得た後, 末梢血を採取した。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冻後トライトンX-100融解変法²⁵⁾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

Caliらの報告¹⁰⁾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CYP 27遺伝子配列をもとに, 全9エクソンとプロモーター領域, ポリ-Aシグナルすべてについて設計した18-25塩基長のプライマー全11組を作成した (表2)。プライマーの合成は, 日本製粉生物科学研究部 (グライナー・ジャパン, 東京) に委託した。Tm値の解析にはMacMeltTMソフトウェア (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) を使用した。

DNA断片の増幅にはSaikiら²⁶⁾によるPCR法を用いた。高分子DNA 1 μgを鋳型DNAとして40pMのプライマー1セットと終濃度200 μM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 (グライナー・ジャパン, 東京) を0.01%ゼラチンを含む緩衝液 (終濃度10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂) に加え, 反応液が計50 μlとなるように再減菌蒸留水を加え攪拌した。遠心して反応液を集め, 50 μlのミネラルオイル (Sigma) を滴下して蒸発を防ぎ, 95℃1分, 68℃5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, サーマル・サイクラー (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, USA) を用いて30サイクルの反応を行った。

増幅したDNA断片は3%の低融点アガロースゲル (Nusive, FMC, Corporation, Rockland, USA) に鎖長マーカー φ-X174/Hae III消化物 (東洋紡, 東京) と共に泳動して断片長を確認した。

3. PCR一本鎖構形体多型 (PCR-single strand conformational

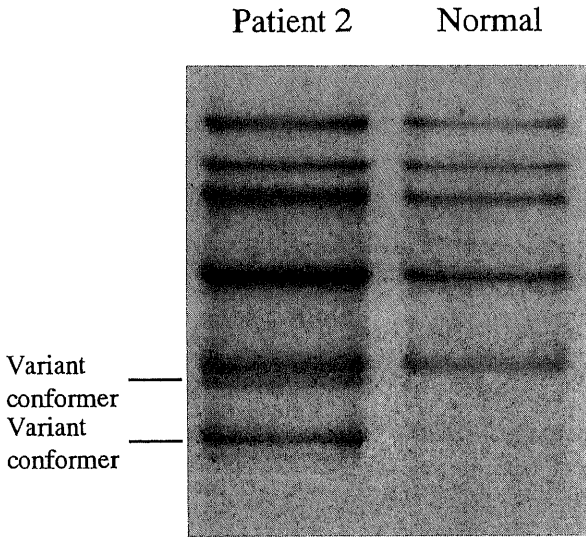


Fig. 6. PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analysis in the exon 8 of 27-hydroxylase gene in patient 2. The bars along the right side indicate the wild pattern (normal). The patient 2 shows the mutational pattern with variant conformer in the exon 8.

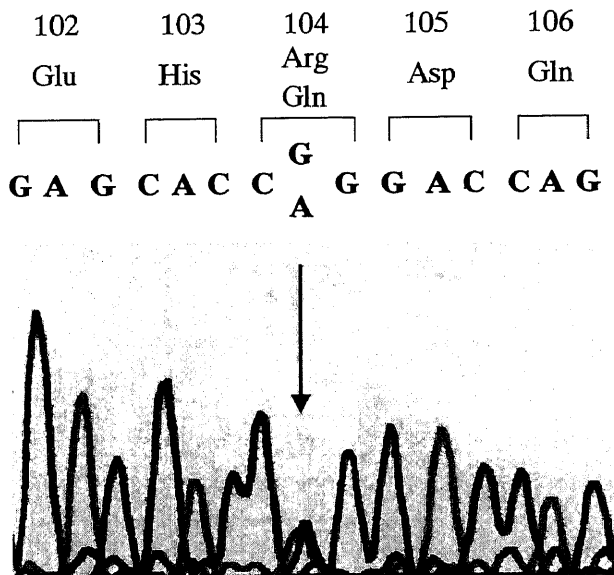


Fig. 7. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 2 of 27-hydroxylase gene. Each curve indicates adenine (A), cytosine (C), guanine (G) and thymine (T). The graph is the result of patient 1. The arrow indicates A peak of the mutant and G peak of the wild type.

polymorphism, 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 5× Tris-ホウ酸-EDTA (Tris-boric acid-EDTA) (PH 8.0) 泳動用緩衝液とし、泳動直前に 1× の濃度に希釈した。

0.5mM EDTA 2 μ l, 5N NaOH 10 μ l, 再滅菌蒸留水 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℃ 5分, 96℃ 3分加熱後、0℃ に急冷し一本鎖に変性させた。そのうえで、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℃, または室温のもと 100V, 10~12時間 で泳動した。

泳動終了後、バンドの検出は SYBR Gold nucleic acid gel stain

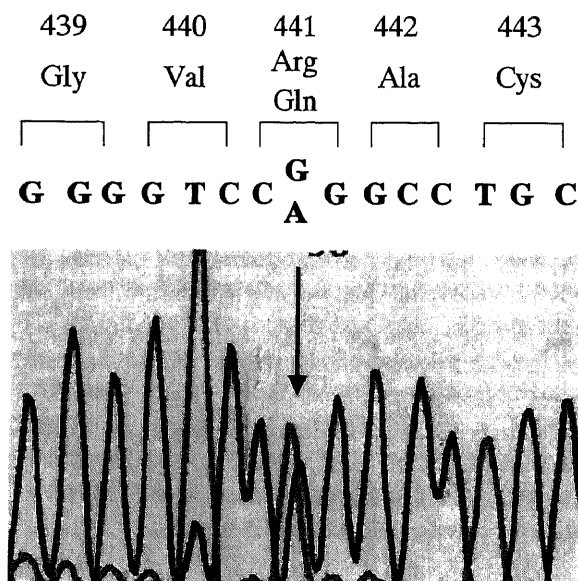


Fig. 8. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 8 of 27-hydroxylase gene. The graph is the result of patient 1. The arrow indicates A peak of the mutant and G peak of the wild type.

(Molecular Probes, USA) を用いプロトコールに従って染色し、紫外線発光にて撮影した。異常バンドが認められたエクソンは次の直接塩基配列決定を行った。

4. 自動化直接塩基配列決定法 (direct sequencing)

PCRで増幅した DNA 断片を 1% の低融点アガロースゲル (Nusieve, FMC, Corporation, Rockland, USA) 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、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。マイクロピュアとマイクロコン-50 (Amicon) を組み合わせてこの DNA 断片を 10000 回転 20 分間遠心した。再滅菌蒸留水 20 μ l を加え再度遠心し、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、それを直接塩基配列決定法の鋳型 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 (Perkin-Elmer Corporation) を用い

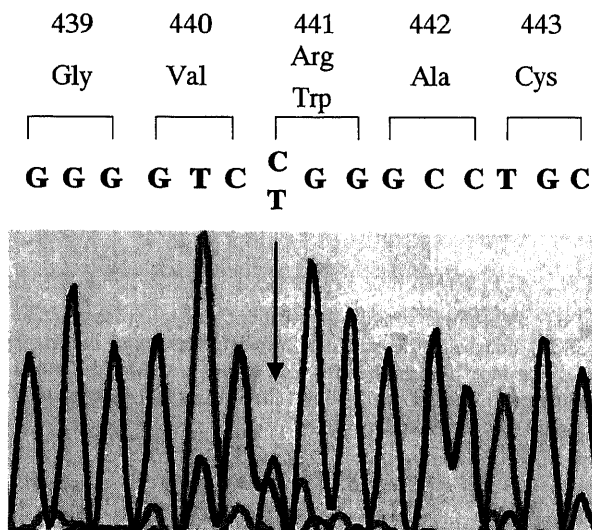


Fig. 9. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 8 of 27-hydroxylase gene. The graph is the result of patient 2. The arrow indicates T peak of the mutant and C peak of the wild type.

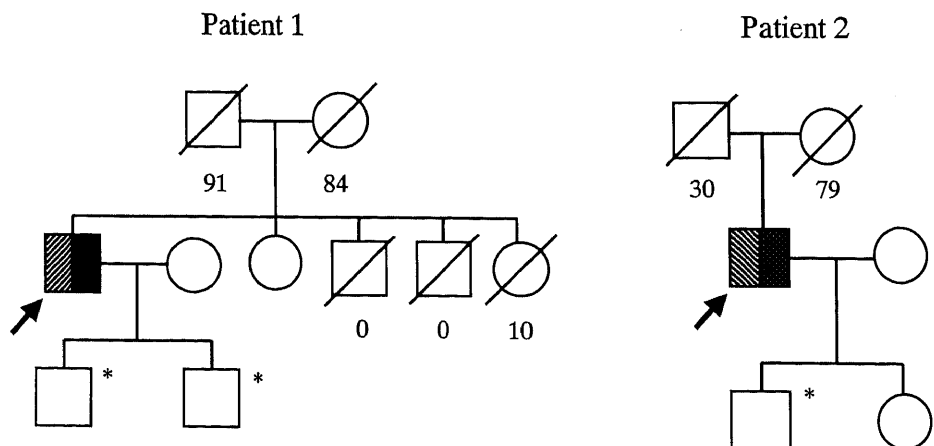


Fig. 10. The pedigrees of the two patients with CTX. The arrow in the pedigree indicates the proband. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. The number in the pedigree demonstrates age of death. There is no consanguinity in both patient 1 and patient 2. ■, compound heterozygous patient with R104Q and R441Q. ■, compound heterozygous patient with R441W and unknown mutant. \square/\square , deceased. * Not genetically examined.

Table 3. 27-hydroxylase gene mutations reported in Japanese

Position	Mutation	Nucleotide change	Amino acid change	First report
Missense mutation				
1. Exon2	R104W	430 C→T	Arg 104 Trp	Nakashima, 1994
2. Exon2	R104Q	431 G→A	Arg 104 Gln	Nozue, 2001
3. Exon6	R362S	1204 C→A	Arg 362 Ser	Chen, 1998
4. Exon6	R362H	1205 G→A	Arg 362 His	Chen, 1996
5. Exon7	P368R	1223 C→G	Pro 368 Arg	Okuyama, 1996
6. Exon7	R372Q	1235 G→A	Arg 372 Gln	Chen, 1997
7. Exon8	R441W	1441 C→T	Arg 441Trp	Kim, 1994
8. Exon8	R441Q	1442 G→A	Arg 441 Gln	Kim, 1994
Nonsense mutation				
9. Exon3	E162stop	604 G→T	Glu 162 stop	Wakamatsu, 1999
Splicing mutation				
10. Exon2	G112G	456 G→T	Skipping exon2	Chen, 1998
11. Intron7	1284+1 G to A	1284+1 G→A	Skipping exon7	Shiga, 1999

Three missense mutations: R104Q, R441W, R441Q shown in bold letters were identified in this study.

イクルシーケンス法を行った。

自動化直接塩基配列決定法として、ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Corporation) 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, 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を行い、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. PCR制限酵素切断多型 (PCR-restriction fragment length polymorphism, 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PCR産物を切断した。再度PCR法でDNA断片を増幅し、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用緩衝液を加え、酵素の至適温度条件下にて6時間反応させた。その後10%-20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲル(アトー、東京)に、10 μlの反応産物、制限酵素を作用させていないPCR産物、鎖長マーカーφ-X174/Hae III消化物(東洋紡、東京)を同時に泳動し、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の鑑別を行った。泳動終了後、バンドの検出はエチジウムブロマイド染色とし、紫外線発光にて撮影した。

エクソン2におけるR104Q変異のスクリーニングには、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2内には正常の塩基配列において1か所Hpa IIの認識配列が存在するが、変異の存在により切断部位の配列が変化し、制限酵素による切断を受けなくなる。その結果、制限酵素により切断された結果生ずる161bpのバンドしか観察されなければ本変異を有していないと判断、制限酵素により切断された161bpのバンドと切断されない199bpのバンドの両方が観察されれば本変異のヘテロ接合体、199bpのバンドしか観察されなければ本変異のホモ接合体と判断した(図2-A)。

エクソン8におけるR441Q変異のスクリーニングには、通常のPCR産物に制限酵素Aat I(東洋紡)を37℃で6時間切断反応

させた。エクソン8内には正常の塩基配列においてAat Iの認識配列が存在しないため制限酵素による切断を受けないが、変異の存在により1か所制限酵素の認識配列が出現する。その結果、制限酵素により切断された結果生ずる178bpのバンドしか観察されなければ本変異のホモ接合体と判断、制限酵素により切断された178bpのバンドと切断されない292bpのバンドの両方が観察されれば本変異のヘテロ接合体、292bpのバンドしか観察されなければ本変異を有していないと判断した(図3-A)。

エクソン8におけるR441W変異のスクリーニングには、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8内には正常の塩基配列において1か所Hpa IIの認識配列が存在するが、変異の存在により切断部位の配列が変化し、制限酵素による切断を受けなくなる。その結果、制限酵素により切断された結果生ずる182bpのバンドしか観察されなければ本変異を有していないと判断、制限酵素により切断された182bpのバンドと切断されない292bpのバンドの両方が観察されれば本変異のヘテロ接合体、292bpのバンドしか観察されなければ本変異のホモ接合体と判断した(図4-A)。

6. 家系内調査

CTXは常染色体劣性遺伝性疾患であるため家系図を作成し、血族結婚がないか可能な限り家族歴を調査した。

7. CDCAによる治療効果

CTX患者2症例に対して、CDCA投与前に血清コレステロール、シトステロール、脳波検査、MRI検査を施行し、痴呆の評価には長谷川式簡易知能評価スケール(HDS-R)を用いた。対象者は16時間絶食後の早朝空腹時に静脈採血し、TC、TGは酵素法²⁷⁾²⁸⁾で測定し、HDL-Cは沈殿法²⁹⁾で測定した。低比重リポ蛋白(low density lipoprotein, LDL)受容体活性は、フローサイトメトリー法³⁰⁾で測定し、コレステリルエステル転送蛋白(cholesteryl ester transfer protein, CETP)量測定はELISA法³¹⁾で測定した。血清コレステロールはガスクロマトグラフィ³²⁾にて定量した。

CDCA(600mg/日)投与4週後に上記項目を再評価し、CDCAによる治療効果を判定した。

成 績

I. CYP 27 遺伝子解析結果

1. PCR-SSCP法による異常構成体の検出

CTX患者2症例におけるPCR-SSCP法によるスクリーニングにおいて、症例1ではCYP 27遺伝子のエクソン2とエクソン8に、症例2ではエクソン8に異常構成体が検出された。

図5は正常者および症例1のSSCP泳動パターンである。症例1には、正常者と異なるバンドがエクソン2に1本、エクソン8に2本認められた。

図6は正常者および症例2のSSCP泳動パターンである。症例2には、正常者と異なるバンドがエクソン8に2本認められた。

2. 直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列の決定

症例1におけるCYP 27遺伝子のエクソン2の塩基配列解析の結果を図7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症例1ではGとAの両方のバンドが観察された。したがって本変異はエクソン2内のGからAへの一塩基置換であり、症例1は同変異のヘテロ接合体と確認された。本変異により、CYP 27の104番目のアミノ酸ArgがGlnに置換されることになる(R104Q)(図7)。本変異は、これまでに報告がない新変異であった。

症例1におけるCYP 27遺伝子のエクソン8の塩基配列解析の結果を図8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、症例1ではGとAの両方のバンドが観察された。したがって、本変異はエクソン8内のGからAへの一塩基置換であ

り、症例1は同変異のヘテロ接合体と確認された。本変異により、CYP 27の441番目のアミノ酸ArgがGlnに置換されることになる(R441Q)(図8)。本変異は、Kimら³³⁾が1994年に報告した変異と同変異であった。以上から、症例1はR104Q変異とR441Q変異の複合型ヘテロ接合体であることが確認された。

症例2におけるCYP 27遺伝子のエクソン8の塩基配列解析の結果を図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、症例2ではCとTの両方のバンドが観察された。したがって、本変異はエクソン8内のCからTへの一塩基置換であり、症例2は同変異のヘテロ接合体と確認された。本変異により、CYP 27の441番目のアミノ酸ArgがTrpに置換されることになる(R441W)(図9)。本変異も、Kimら³³⁾が1994年に報告した変異と同変異であった。

3. PCR-RFLP法による変異の確認

図2-BにPCR-RFLP法によるR104Q変異の確認の結果を示した。症例1は、本変異のヘテロ接合体であると確認された。一般住民検診受診者100例(200対立遺伝子)を対象に本変異のスクリーニングを施行したが、一例も本変異を認めなかった。

図3-BにPCR-RFLP法によるR441Q変異の確認の結果を示した。症例1は、本変異のヘテロ接合体であると確認された。

図4-BにPCR-RFLP法によるR441W変異の確認の結果を示した。症例2は、本変異のヘテロ接合体であると確認された。

II. 家系内調査

図10に症例1と症例2の家系図を示した。両家系とも両親に血族結婚はなかった。症例1の家系では、発端者の次男が精神

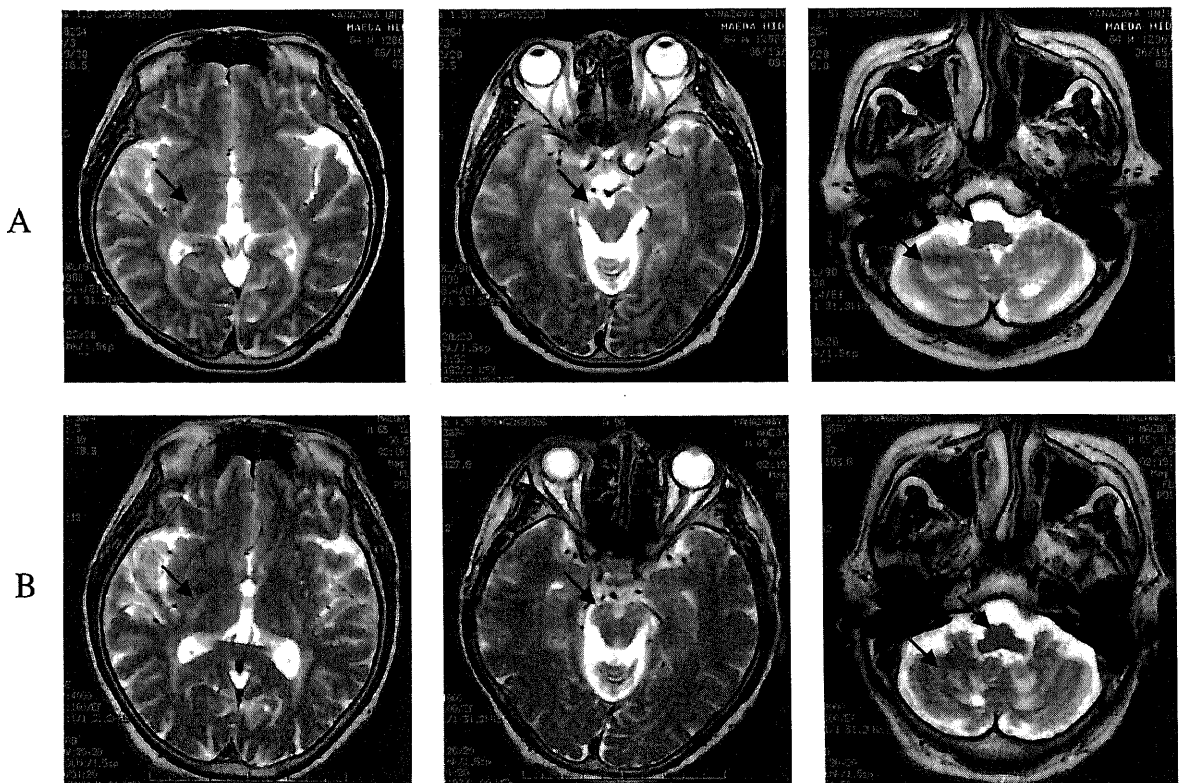


Fig. 11. (A) T2-weighted MRI of patient 1 in transverse orientation before treatment. (B) T2-weighted MRI of the same patient 4 weeks after treatment of CDCA. Cerebral and cerebellar atrophy is evident. The arrow indicates hyperintensity of bilateral internal capsule, cerebral peduncle, pons and cerebellar hemisphere in both (A) and (B).

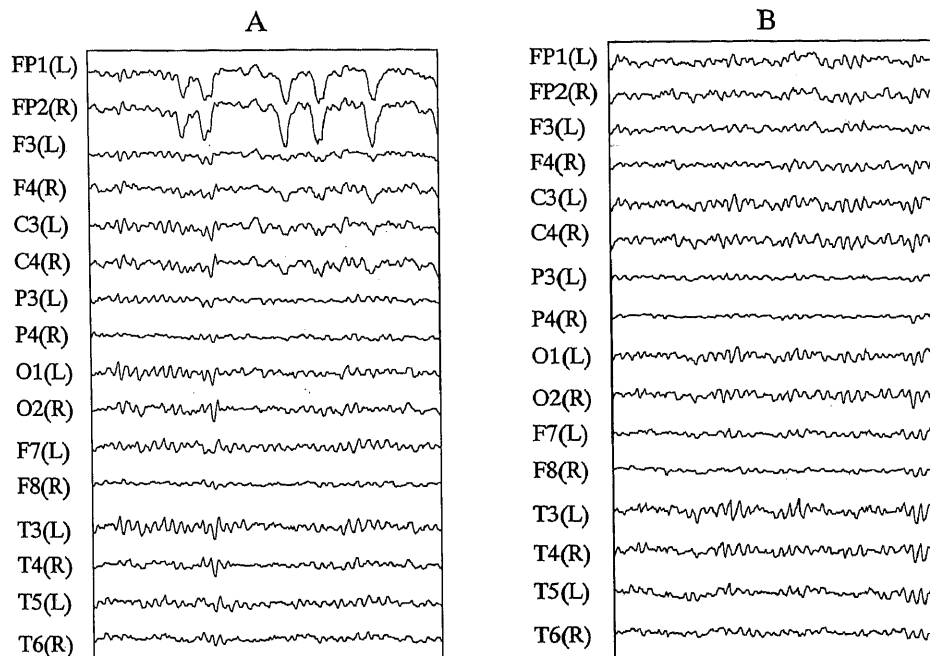


Fig. 12. Electroencephalogram (EEG) in patient 1. The EEG in panel (A), obtained before treatment, shows theta and delta polymorphic activity. The EEG in panel (B), obtained from the same patient 4 weeks after treatment with CDCA, shows appearance of alpha rhythm and elimination of abnormal slow activity.

遅滞を認めるもののCYP27遺伝子の解析は未施行のため、本症との因果関係は不明であった。

Ⅲ. CDCAによる治療効果

症例1におけるCDCA投与前後のMRI所見を図11に、脳波所見を図12に示した。CDCA投与前、MRIでは大脳、小脳の萎縮と左右の内包、大脳脚、橋、小脳半球にT2強調画像で高信号域を認め、脳波では5~7Hzのシータ波がび漫性に出現しており、ときに高振幅のデルタ波を認めた。CDCA投与4週後、血清コレステロール値、MRI所見は不変(図11)であったが、脳波上アルファ波の出現を認め(図12)、HDS-R 14点から19点に痴呆が改善し、失調性歩行、つぎ足歩行、ロンベルグ試験の改善を認めた。

同様に、症例2に対してCDCA投与を行ったところ、CDCA投与前後で血清コレステロール値、MRI所見は不変であったが、CDCA投与4週後、脳波上アルファ波の出現を認め、HDS-R 4点から10点に痴呆が改善し、失調性歩行、痙性歩行の改善を認めた。

考 察

本研究では、日本人CTXにおけるCYP 27遺伝子変異に関する研究を行った。臨床的にCTXと診断された2症例を対象としたCYP 27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(R104Q)を見出した。症例1はこのR104Q変異とR441Q変異の複合型ヘテロ接合体であることが明らかとなった。R441Q変異はKimら³³⁾が1994年に報告した変異と同変異であった。彼らは、R441Q変異を有する症例の皮膚から線維芽細胞を採取し、CYP 27活性を測定している。その結果、R441Q変異を有するホモ接合体では酵素活性が測定できなかったと報告している³³⁾。また、ChenらはR441Q変異のcDNAをCos細胞へ導入し、CYP 27活性が非常に低下していたことを報

告している³⁴⁾。

また、症例2のCYP 27遺伝子解析により、R441W変異のヘテロ接合体を同定した。このR441W変異もKimら³³⁾が報告した変異と同変異であった。彼らの報告では、R441W変異を有するホモ接合体では酵素活性が正常者の1.4%に低下していた³³⁾。本症例も臨床的にCTXと診断されており、本症が常染色体劣性遺伝性疾患であることからR441W変異の決定により複合型ヘテロ接合体と診断され、改めて別の遺伝子変異の存在が示唆された。PCR-SSCP法³⁵⁾³⁶⁾の出現により、遺伝性疾患における遺伝子異常の検討が一気に加速した。近年、点変異の新しい検出法として、PCR変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)法が非常に有用であることが報告された。本法はPCR-SSCP法に比べ、検出力および再現性の点で優れており、PCR-SSCP法で検出困難であった点変異がPCR-DGGE法では検出可能であったとの報告が数多く認められる^{37)~40)}。本症例も別の遺伝子変異を有している可能性が残り、PCR-DGGE法による検討が今後の課題である。

表3に、これまでに日本人CTX患者を対象に報告されたCYP 27遺伝子変異と自験例をまとめて示した^{33)34)41)~49)}。435番目から464番目のアミノ酸はヘム補因子に対するリガンドとして重要な領域であり、351番目から365番目のアミノ酸はフェレドキシン(ferredoxin)と結合する領域と考えられている¹⁶⁾¹⁷⁾⁵⁰⁾。よって、重要な領域での変異は蛋白の構造変化を起し機能低下につながるものと考えられている¹²⁾。日本で報告されているCYP 27遺伝子異常も、これら重要な領域に多く認められる(表3)。本研究で観察されたR104Q変異、R441Q変異、R441W変異もヘム補因子に対するリガンドとして重要な領域¹²⁾であり、蛋白の構造変化から機能低下につながっているものと考えられた。

コレステロールを体外に排泄する機構は二つしか存在しな

い、一つはコレステロールを直接胆汁中に排泄する機構であり、もう一つはコレステロールを胆汁酸に変換し胆汁中に排泄する機構である。主要なコレステロール排泄機構は、コレステロールを胆汁酸に変換し胆汁中に排泄する後者の経路である。胆汁酸合成系に関わる疾患は極めて稀であるが、コレステロールの排泄機構を解明するためには大変重要なモデルである。その一つがCTXであり、CYP 27 遺伝子異常により、シトクロム P450 である CYP 27 活性が低下する常染色体劣性遺伝性疾患である。本症は、血清コレステロール値が正常で腱黄色腫を認めること、原因不明の若年性白内障を認めること、知能低下、錐体路症状、小脳症状などの神経症状を認めることより診断される。また、本症では若年性動脈硬化症を示す。血清コレステロール値が上昇していることも重要であるが、コレステロール値の上昇は家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia, FH)、シトステロール血症、閉塞性胆道疾患、甲状腺機能低下症でも認められる。FH は、LDL 受容体遺伝子の変異⁵¹⁾により発症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、アキレス腱をはじめとする腱黄色腫⁵²⁾、および早発性冠動脈硬化症⁵³⁾を 3 主徴とする。CTX との鑑別は、臨床的には LDL コレステロール値から比較的容易であるが、これまで CTX として早い年代に報告されているものの中には、高コレステロール血症をとまなう例が散見され注意を要する^{54)~56)}。シトステロール血症は、常染色体劣性遺伝性疾患で、植物ステロールが多量に蓄積する結果、腱黄色腫、若年性動脈硬化症を示し、血清コレステロール値も正常の約 10 倍程度蓄積するが、一般に神経症状を伴わないことより鑑別できる¹⁾。

若年性動脈硬化症ないし早発性冠動脈硬化症は、CTX では高頻度に出現する合併症の一つである²¹⁾⁵⁷⁾。胆汁酸代謝はコレステロール合成経路の後に続く代謝経路であり、互いに緊密な調節連絡をもつ。CTX ではコレステロール生合成は亢進しており、本症における動脈硬化の進展、すなわち動脈壁へのステロール蓄積機序の解明にとって血清脂質・リポ蛋白代謝を詳細に検討することは重要である。Fujiyama ら⁵⁷⁾は CTX8 症例において血清脂質、リポ蛋白の検討を行い、正常コントロールと比較して TC、低比重リポ蛋白コレステロール (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、TG、超低比重リポ蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) などが有意に低下していること、また HDL-C、とくに HDL2-C、アポリポ蛋白 A1 が高値を示すことなどを報告している。彼らは患者線維芽細胞および末梢血単球/マクロファージ細胞を用いて LDL およびアセチル LDL の取り込み実験を行った。単球/マクロファージ細胞のアセチル LDL 取り込みの亢進は認めず、線維芽細胞の LDL の結合、取り込みの亢進が認められ、LDL 受容体がアップレギュレーションしていることが推定されている。CTX における脂質蓄積の機序は不明であるが、コレステロール生合成が亢進していることは明らかであり、しかも通常ではコレステロール生合成が亢進しているときに認められる細胞外からのコレステロール取り込みの抑制、すなわち LDL 受容体のダウンレギュレーションは認められず、むしろアップレギュレーションしており、CTX ではこの「脱」レギュレーションしていることが脂質蓄積の機序に関与しているのではないかと推定される。

CTX における神経組織への脂質蓄積は、さらに不明な点が多い。Byun ら⁵⁸⁾は、マウスに 1% コレスタノールを 32 週間投与を行い、血清および肝臓では 2~4 週間後にはコレスタノール

濃度は対象群の 70~100 倍上昇し、その後徐々に減少し、32 週目には最高値の 50~60% に変化した。小脳では直線的に増加し、32 週後には 10 倍濃度に達した。Buchmann ら⁵⁹⁾は、コレステロール投与を行い比較検討しているが、コレステロール投与を同じ条件で行っても脳内のステロール濃度には変化を認めていない。これらのことから、血清中コレスタノール濃度が上昇すると、脳組織では一方的にコレスタノールを取り込み蓄積する。脳組織では肝臓などと異なり、ステロールの組織からの流出経路、すなわち排泄の機構が生理的に不活発のため、神経組織へのステロール蓄積が進展していくものと考えられる。また、Salen ら⁶⁰⁾は CTX 患者の髄液中のコレスタノールおよびアポリポ蛋白を測定し、コレスタノール値が正常髄液に比べて 1.5~20 倍、アポリポ蛋白 B が 100 倍高値を示すと報告し、CTX では血液~脳関門の選択的透過性が失われている可能性を指摘している。彼らは、血液~脳関門の障害に関しては胆汁アルコールが障害をひき起こす可能性を指摘しているが、実証されていない。

神経組織にステロールの蓄積が進行すると細胞内代謝の障害を生じ、細胞は退行変性して行く機序が考えられる。また、コレステロールはミエリンの主要構成成分であるが、コレスタノールはコレステロールと類似の構造を持つためコレステロールと置換し、ミエリンの機能的障害をひき起こす可能性が推定される。Pop ら⁶¹⁾は、本症の神経障害は神経軸索の要素が重要であると報告している。また、Inoue ら⁶²⁾は人工環境内での実験で、コレスタノールは培養細胞のアポトーシスを誘導すると報告している。

CTX 患者の脳 MRI 所見として、白質および基底核における局所またはび漫性の T2 強調像での高信号域と、大脳、小脳の萎縮が報告されている^{63)~69)}。本研究においても 2 症例ともに大脳、小脳の萎縮と基底核、橋、小脳半球の T2 強調像での高信号域を認めた。近年、本症における特徴的な MRI 所見がようやく報告されはじめている。Stefano ら⁷⁰⁾は、本症では N-アセチルアスパラギン酸の磁気調が低下し、乳酸塩の磁気調が上昇していると報告している。N-アセチルアスパラギン酸の磁気調の低下は軸索変性を表しており、乳酸塩の磁気調の上昇はび漫性の脳ミトコンドリアの機能障害のためであると考えられている。

CTX は、胆汁酸合成障害のため肝臓内胆汁酸プールが減少している。そのため、HMG-CoA 還元酵素、7 α -水酸化酵素に対するフィードバックが低下するため両酵素活性は増加し、本症における代謝異常、すなわちコレステロール、コレスタノール、胆汁アルコールなどの産生は助長される。Salen ら⁷¹⁾は胆汁酸プールを補充する目的で、とくに産生が著減している CDCA を投与し、コレステロール、コレスタノール産生を抑制することを報告した。その後、彼らは 17 例の CTX 患者に長期投与を行い、少なくとも 1 年後から知能低下、錐体路症状、小脳症状、末梢神経症状などの臨床症状および脳波異常、CT スキャンでの異常所見の改善を認めている²³⁾。本研究では CTX 患者 2 症例に対して CDCA 投与を行い、4 週後という短期間で CDCA による効果を評価した。2 症例とも血清コレスタノール値、MRI 所見は CDCA 投与前後で不変であったが、CDCA 投与 4 週後に脳波の改善、痴呆の改善、神経症状の改善を認めた。本症に対する CDCA による治療は、検査所見の改善以前に中枢神経系の機能的改善を認める可能性が示唆された。

これらの意味からもCTXを早期から確診するための遺伝子解析の意義は大きい。これまでに、本疾患の遺伝子型と臨床像の関係について検討した結果が報告されているが、いずれも明白な関係を認めていない⁷²⁾⁷³⁾。CTXという一つの疾患概念の中で、個々の家系、或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CTX患者2症例におけるCYP 27遺伝子解析をPCR-SSCP法、直接塩基配列決定法およびPCR-RFLP法により検索し、また本症に対するCDCAによる治療効果を検討し、以下の結果を得た。

1) CTX患者において、CYP 27遺伝子のエクソン2の104番目のアミノ酸Argに対応する配列CGGがGlnに対応する配列CAGへと変化する変異(R104Q)を検出した。この変異はこれまでに報告がなく、新変異であった。また、同一症例からCYP 27遺伝子のエクソン8の441番目のアミノ酸Argに対応する配列CGGがGlnに対応する配列CAGへと変化する変異(R441Q)を検出した。本症例はR104Q変異とR441Q変異の複合型ヘテロ接合体であることが判明した。

2) 別のCTX患者において、CYP 27遺伝子のエクソン8の441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へと変化する変異(R441W)を検出した。

3) CTXに対するCDCAによる治療は、検査所見の改善以前に中枢神経系の機能的改善をもたらす可能性が示唆された。

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大学院医学系研究科血管分子遺伝学講座の東方利徳博士、野原 淳博士に心から謝意を表します。また、御助言、御協力を頂きました金沢大学医学部保健学科稲津明広助教授に厚く御礼申し上げます。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血管分子遺伝学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、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富田勝郎教授(金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻機能再生学講座機能再建学)、武田三昭先生(富山赤十字病院内科)に感謝いたします。また、本症例の神経学的所見を御高配頂きました駒井清暢先生(金沢大学大学院医学系研究科脳医科学専攻脳病態医学講座脳老化・神経病態学)に感謝いたします。

本研究の一部は平成13年度日本動脈硬化学会総会(平成13年6月7日-8日、東京)において発表した。

文 献

- 1) Bjorkhem I, Muri-Boberg K. Inborn errors in bile acid biosynthesis and storage of sterols other than cholesterol. In CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases*, 7th ed, p2073-2099, McGraw-Hill, New York, 1995
- 2) van Bogaert L, Scherer HJ, Epstein E. Une forme cerebrale de cholesterinose generalisee. Paris, Masson et cie, 1937
- 3) Kuriyama M, Fujiyama J, Yoshidome H, Takenaga S, Matsumoto K, Kasama T, Fukuda K, Kuramoto T, Hoshita T, Seyama Y, Okaku Y, Osame M. Cerebrotendinous xanthomatosis: clinical and biochemical evaluation of eight

patients and review of the literature. *J Neurol Sci* 102: 225-232, 1991

4) Menkes JH, Schimschock JR, Swanson PD. Cerebrotendinous xanthomatosis. The storage of cholestanol within the nervous system. *Arch Neurol* 19: 47-53, 1968

5) Salen G. Cholestanol deposition in cerebrotendinous xanthomatosis. A possible mechanism. *Ann Intern Med* 75: 843-851, 1971

6) Salen G, Shefer S, Tint GS, Nicolau G, Dayal B, Batta AK. Biosynthesis of bile acids in cerebrotendinous xanthomatosis. Relationship of bile acid pool sizes and synthesis rates to hydroxylations at C-12, C-25, and C-26. *J Clin Invest* 76: 744-751, 1985

7) Honda A, Salen G, Shefer S, Matsuzaki Y, Xu G, Batta AK, Tint GS, Tanaka N. Regulation of 25- and 27-hydroxylation side chain cleavage pathways for cholic acid biosynthesis in humans, rabbits, and mice: assay activities by high-resolution gas chromatography-mass spectrometry. *J Lipid Res* 41: 442-451, 2000

8) Setoguchi T, Salen G, Tint GS, Mosbach EH. A biochemical abnormality in cerebrotendinous xanthomatosis. Impairment of bile acid biosynthesis associated with incomplete degradation of the cholesterol side chain. *J Clin Invest* 53: 1393-1401, 1974

9) Oftebro H, Bjorkhem I, Skrede S, Schreiner A, Pederson JJ. Cerebrotendinous xanthomatosis: a defect in mitochondrial 26-hydroxylation required for normal biosynthesis of cholic acid. *J Clin Invest* 65: 1418-1430, 1980

10) Cali JJ, Russell DW. Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reactions in bile acid biosynthesis. *J Biol Chem* 266: 7774-7778, 1991

11) Cali JJ, Hsieh CL, Francke U, Russell DW. Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underline cerebrotendinous xanthomatosis. *J Biol Chem* 266: 7779-7783, 1991

12) Lee MH, Hazard S, Carpten JD, Yi S, Cohen J, Gerhardt GT, Salen G, Patel SB. Fine-mapping, mutation analyses, and structural mapping of cerebrotendinous xanthomatosis in U.S. pedigrees. *J Lipid Res* 42: 159-169, 2001

13) Gonzalez FJ. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev* 40: 243-288, 1988

14) Wikvall K. Hydroxylations in biosynthesis of bile acid. Isolation of a cytochrome P-450 from rabbit liver mitochondria catalyzing 26-hydroxylation of C27-steroids. *J Biol Chem* 259: 3800-3804, 1984

15) Okuda K. Liver mitochondrial P450 involved in cholesterol catabolism and vitamin D activation. *J Lipid Res* 35: 361-372, 1994

16) Andersson S, Davis DL, Dahlback H, Jornvall H, Russell DW. Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem* 264: 8222-8229, 1989

17) Leitersdorf E, Reshef A, Meiner V, Levitzki R, Schwartz SP, Dann EJ, Berkman N, Cali JJ, Klapholz L, Berginer VM.

Frameshift and splice-junction mutations in the sterol 27-hydroxylase gene cause cerebrotendinous xanthomatosis in Jews of Moroccan origin. *J Clin Invest* 91: 2488-2496, 1993

18) Bjorkhem I. Mechanism of degradation of the steroid side chain in the formation of bile acid. *J Lipid Res* 33: 455-471, 1992

19) Salen G, Polito A. Biosynthesis of 5 α -cholestan-3 β -ol in cerebrotendinous xanthomatosis. *J Clin Invest* 51: 134-140, 1972

20) Skrede S, Bjorkhem I, Buchmann MS, Hopen G, Fausa O. A novel pathway for biosynthesis of cholestanol with 7 α -hydroxylated C27-steroids as intermediates, and its importance for the accumulation of cholestanol in cerebrotendinous xanthomatosis. *J Clin Invest* 75: 448-455, 1985

21) 栗山 勝. Cerebrotendinous xanthomatosis I. 報告例153症例の臨床症候. *神経内科* 34: 653-670, 1991

22) Verrips A, van Engelen BG, ter Laak H, Gabreels-Festen A, Janssen A, Zwarts M, Wevers RA, Gabreels FJ. Cerebrotendinous xanthomatosis. Controversies about nerve and muscle: observations in ten patients. *Neuromuscul Disord* 10: 407-414, 2000

23) Berginer VM, Salen G, Shefer S. Long-term treatment of cerebrotendinous xanthomatosis with chenodeoxycholic acid. *N Engl J Med* 311: 1649-1652, 1984

24) Kasama T, Byun DS, Seyama Y. Quantitative analysis of sterol in serum by high-performance liquid chromatography. Application to the biochemical diagnosis of cerebrotendinous xanthomatosis. *J Chromatogr* 400: 241-246, 1987

25) 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

26) 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

27) Allain CC, Poon LS, Chan SG, Richmond CW, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20: 470-475, 1974

28) Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 19: 476-482, 1973

29) Bursterin M, Scholnich HR. Lipoprotein-polyanionmetal interactions. *Adv Lipid Res* 11: 67-108, 1973

30) Traill KN, Jurgens G, Bock G, Huber L, Schonitzer D, Widhalm K, Winter U, Wick G. Analysis of fluorescent low density lipoprotein uptake by lymphocytes. Paradoxical increase in the elderly. *Mech Ageing Dev* 40: 261-288, 1987

31) Kiyohara T, Kiriya R, Zamma S, Inazu A, Koizumi J, Mabuchi H, Chichibu K. Enzyme immunoassay for cholesteryl ester transfer protein in human serum. *Clin Chim Acta* 271: 109-118, 1998

32) Ishikawa T, Brazier JB, Stewart LE, Fallot RW, Glueck CJ. Direct quantitation of cholestanol in plasma by gas-liquid chromatography. *J Lab Clin Med* 87: 345-353, 1976

33) Kim KS, Kubota S, Kuriyama M, Fujiyama J, Bjorkhem I, Eggertsen G, Seyama Y. Identification of new mutations in sterol 27-hydroxylase gene in Japanese patients with cerebrotendinous

xanthomatosis (CTX). *J Lipid Res* 35: 1031-1039, 1994

34) Chen W, Kubota S, Kim KS, Cheng J, Kuriyama M, Eggertsen G, Bjorkhem I, Seyama Y. Novel homozygous and compound heterozygous mutations of sterol 27-hydroxylase gene (CYP27) cause cerebrotendinous xanthomatosis in three Japanese patients from two unrelated families. *J Lipid Res* 38: 870-879, 1997

35) 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

36) 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

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

38) Eiken HG, Knappskog PM, Guldberg 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

39) Henderson BG, Wenham PR, Ashby JP, Blundell G. Detecting familial defective apolipoprotein B-100: three molecular scanning methods compared. *Clin Chem* 43: 1630-1634, 1997

40) Stothard JR, Frame IA, Miles MA. Use of polymerase chain reaction-based single strand conformational polymorphism and denaturing gradient gel electrophoresis methods for detection of sequence variation of ribosomal DNA of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 27: 339-343, 1997

41) Okuyama E, Tomita S, Takeuchi H, Ichikawa Y. A novel mutation in the cytochrome P450₂₇ (CYP27) gene caused cerebrotendinous xanthomatosis in a Japanese family. *J Lipid Res* 37: 631-639, 1996

42) Wakamatsu N, Hayashi M, Kawai H, Kondo H, Gotoda Y, Nishida Y, Kondo R, Tsuji S, Matsumoto T. Mutations producing premature termination of translation and an amino acid substitution in the sterol 27-hydroxylase gene cause cerebrotendinous xanthomatosis associated with parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67: 195-198, 1999

43) Nagai Y, Hirano M, Mori T, Takakura Y, Tatami S, Ueno S. Japanese triplets with cerebrotendinous xanthomatosis are homozygous for a mutant gene coding for sterol 27-hydroxylase (Arg441Trp). *Neurology* 46: 571-574, 1996

44) Nakashima N, Sakai Y, Sakai H, Yanase T, Haji M, Umeda F, Koga S, Hoshita T, Nawata H. A point mutation in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase in a family with cerebrotendinous xanthomatosis. *J Lipid Res* 35: 663-668, 1994

45) Chen W, Kubota S, Ujike H, Ishihara T, Seyama Y. A novel Arg362Ser mutation in the sterol 27-hydroxylase gene (CYP27) its effects on pre-mRNA splicing and enzyme activity. *Biochemistry* 37: 15050-15056, 1998

- 46) Chen W, Kubota S, Nishimura Y, Nozaki S, Yamashita S, Nakagawa T, Kameda-Takemura K, Menju M, Matsuzawa Y, Bjorkhem I, Eggertsen G, Seyama Y. Genetic analysis of a Japanese cerebrotendinous xanthomatosis family: identification of a novel mutation in the adrenodoxin binding region of the CYP27 gene. *Biochim Biophys Acta* 1317: 119-126, 1996
- 47) Chen W, Kubota S, Seyama Y. Alternative pre-mRNA splicing of the sterol 27-hydroxylase gene (CYP27) caused by a G to A mutation at the last nucleotide of exon 6 in a patient with cerebrotendinous xanthomatosis (CTX). *J Lipid Res* 39: 509-517, 1998
- 48) Shiga K, Fukuyama R, Kimura S, Nakajima K, Fushiki S. Mutation of sterol 27-hydroxylase gene (CYP27) results in truncation of mRNA expressed in leucocytes in a Japanese family with cerebrotendinous xanthomatosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67: 675-677, 1999
- 49) Chen W, Kubota S, Teramoto T, Nishimura Y, Yonemoto K, Seyama Y. Silent nucleotide substitution in the sterol 27-hydroxylase gene (CYP27) leads to alternative pre-mRNA splicing by activating a cryptic 5' splice site at the mutant codon in cerebrotendinous xanthomatosis patients. *Biochemistry* 37: 4420-4428, 1998
- 50) Tuls J, Geren L, Millett F. Fluorescein isothiocyanate specifically modifies lysine 338 of cytochrome P-450sc and inhibits adrenodoxin binding. *J Biol Chem* 264: 16421-16425, 1989
- 51) 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 Diseases*, 7th ed, p1981-2030, McGraw-Hill, New York, 1995
- 52) 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
- 53) Mabuchi H, Koizumi J, Shimizu M, Takeda R. Development of coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 79: 225-232, 1989
- 54) Lewis B, Mitchell WD, Marenah CB, Cortese C, Reynolds EH, Shakir R. Cerebrotendinous xanthomatosis: biochemical response to inhibition of cholesterol synthesis. *Br Med J* 287: 21-22, 1983
- 55) 岩淵 定, 津谷泰夫, 萩原忠文. Cerebrotendinous xanthomatosisと思われる1例. *臨床神経* 14: 306-310, 1974
- 56) Truswell AS, Pfister PJS. Cerebrotendinous xanthomatosis. *Br Med J* 1: 353-354, 1972
- 57) Fujiyama J, Kuriyama M, Arima S, Shibata Y, Nagata K, Takenaga S, Tanaka H, Osame M. Atherogenic risk factors in cerebrotendinous xanthomatosis. *Clin Chim Acta* 200: 1-11, 1991
- 58) Byun DS, Kasama T, Shimizu T, Yorifuji H, Seyama Y. Effect of cholestanol feeding on sterol concentrations in the serum, liver, and cerebellum of mice. *J Biochem* 103: 375-379, 1988
- 59) Buchmann MS, Clausen OP. Effects of cholestanol feeding and cholestyramine treatment on the tissue sterols in the rabbit. *Lipids* 21: 738-743, 1986
- 60) Salen G, Berginer V, Shore V, Horak I, Horak E, Tint GS, Shefer S. Increased concentrations of cholestanol and apolipoprotein B in the cerebrospinal fluid of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. Effect of chenodeoxycholic acid. *N Engl J Med* 316: 1233-1238, 1987
- 61) Pop PH, Joosten E, van Spreken A, Gabreels-Festen A, Jaspard H, ter Laak H, Vos H. Neuroaxonal pathology of central and peripheral nervous systems in cerebrotendinous xanthomatosis (CTX). *Acta Neuropathol* 64: 259-264, 1984
- 62) Inoue K, Kubota S, Seyama Y. Cholestanol induced apoptosis of cerebellar neuronal cells: *Biochem Biophys Res Commun* 256: 198-203, 1999
- 63) Berginer VM, Berginer J, Korczyn AD, Tadmor R. Magnetic resonance imaging in cerebrotendinous xanthomatosis: a prospective clinical and neuroradiological study. *J Neurol Sci* 122: 102-108, 1994
- 64) Swanson PD, Cromwell LD. Magnetic resonance imaging in cerebrotendinous xanthomatosis. *Neurology* 36: 124-126, 1986
- 65) Bencze KS, Vande Polder DR, Prockop LD. Magnetic resonance imaging of the brain and spinal cord in cerebrotendinous xanthomatosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53: 166-167, 1990
- 66) Fiorelli M, Di Piero V, Bastianello S, Bozzao L, Federico A. Cerebrotendinous xanthomatosis: clinical and MRI study (a case report). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53: 76-78, 1990
- 67) Hokezu Y, Kuriyama M, Kubota R, Nakagawa M, Fujiyama J, Osame M. Cerebrotendinous xanthomatosis: cranial CT and MRI studies in eight patients. *Neuroradiology* 34: 308-312, 1992
- 68) Dotti MT, Federico A, Signorini E, Caputo N, Venturi C, Fillosomi G, Guazzi GC. Cerebrotendinous xanthomatosis (van Bogaert-Scherer-Epstein disease): CT and MR findings. *AJNR Am J Neuroradiol* 15: 1721-1726, 1994
- 69) Siebner HR, Berndt S, Conrad B. Cerebrotendinous xanthomatosis without tendon xanthomas mimicking Marinesco-Sjoegren syndrome: a case report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60: 582-585, 1996
- 70) Stefano ND, Dotti MT, Mortilla M, Federico A. Magnetic resonance imaging and spectroscopic changes in brains of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. *Brain* 124: 121-131, 2001
- 71) Salen G, Meriwether TW, Nicolau G. Chenodeoxycholic acid inhibits increased cholesterol and cholestanol synthesis in patients with cerebrotendinous xanthomatosis. *Biochem Med* 14: 57-74, 1975
- 72) Leitersdorf E, Safadi R, Meiner V, Reshef A, Bjorkhem I, Friedlander Y, Morkos S, Berginer VM. Cerebrotendinous xanthomatosis in the Israeli Druze: molecular genetics and phenotypic characteristics. *Am J Hum Genet* 55: 907-915, 1994
- 73) Verrips A, Hoefsloot LH, Steenbergen GCH, Theelen JP, Wevers RA, Gabreels FJ, van Engelen BG, van den Heuvel LP. Clinical and molecular genetics characteristics of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. *Brain* 123: 908-919, 2000

Genetic Analysis of Cerebrotendinous Xanthomatosis Patients and the Effect of Treatment with Chenodeoxycholic Acid Tsuyoshi Nozue, Department of Molecular Genetics of Cardiovascular Disorders, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **111**, 20 — 34 (2002)

Key words cerebrotendinous xanthomatosis, cholestanol, 27-hydroxylase, chenodeoxycholic acid, gene mutation

Abstract

Cerebrotendinous xanthomatosis (CTX) is a rare autosomal recessive sterol storage disease caused by mutations in the sterol 27-hydroxylase gene. Japan has a relatively high prevalence of CTX, with more cases of the disease found here than in any other country. This disease is characterized by the accumulation of cholesterol and cholestanol in various tissues. Accumulation in the central nervous system leads to neurological dysfunction including dementia, spinal cord paresis, and cerebellar ataxia. Accumulation in other tissues causes tendon xanthomas, premature atherosclerosis, and juvenile cataracts. In this study, two Japanese CTX patients were studied genetically and evaluated for the effect of treatment with chenodeoxycholic acid. All 9 exons, the promoter regions and poly-A signals of the 27-hydroxylase 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. Three missense mutations in the 27-hydroxylase gene were identified at different sites. The first mutation was a novel G-to-A mutation in exon 2, resulting in amino acid substitution of Arg (CGG) to Gln (CAG) at codon 104 (R104Q). The second mutation was a G-to-A mutation in exon 8, resulting in amino acid substitution of Arg (CGG) to Gln (CAG) at codon 441 (R441Q). The third mutation was a C-to-T mutation in exon 8, resulting in amino acid substitution of Arg (CGG) to Trp (TGG) at codon 441 (R441W). These three point mutations were located in the heme-ligand binding domain. Case 1 was a compound heterozygote of R104Q and R441Q and case 2 was a heterozygote of R441W. These three different mutations were detected by three PCR-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLPs) using the enzymes *Hpa* II and *Aat* I. On conventional MRI, bilateral hyperintensities of the dentate nuclei on T2-weighted MRI and cerebral and cerebellar atrophy were clearly seen in both cases. The electroencephalograms showed marked derangement with irregular slow theta and delta waves in both cases. Four weeks after treatment with chenodeoxycholic acid (600mg per day), serum cholestanol levels and MRI of the brain showed no change. However, the electroencephalogram, dementia and other neurological dysfunctions improved significantly in both cases. This suggests that treatment with chenodeoxycholic acid may improve the function of central nervous systems even before improvement of the biochemical findings.