遺伝性高低比重リポ蛋白コレステロール血症の分子遺伝学的研究

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 野原, 淳
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9342

遺伝性高低比重リポ蛋白コレステロール血症の分子遺伝学的研究

金沢大学医学部医学科内科学第二講座（主任：馬渕　宏教授）
野　原　　淳

遺伝性高低比重リポ蛋白コレステロール (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 血症は幼少時より高LDL-C血症が持続し，早発性冠動脈硬化症が高頻度に発症する．現在までに低比重リポ蛋白受容体 (low density lipoprotein receptor, LDL-R) 遺伝子異常により生ずる家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia, FH) およびLDL-Rに結合するリガンドであるアポリポ蛋白B-100 (apolipoprotein B-100, apo B-100) 遺伝子異常により生ずる家族性欠陥アポB血症 (familial defective apolipoprotein B-100, FDB) がその原因となることが知られている．本研究では両疾患の遺伝子異常を検討するために，近年点変異を高感度に検出できる新しい方法として注目されているPCR変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) 法を用いて以下の検討を行った．まず臨床像からFHホモ接合体と考えられた5症例とその家族を対象とし，そのLDL-R遺伝子の全エクソンおよびプロモーター領域の遺伝子異常の有無を検討した．明らかとなった遺伝子変異については，PCR-制限酵素切断多型 (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 法を用いて独立した201家系のFHヘテロ接合体を対象とし頻度調査を行った．次に臨床診断されたFHヘテロ接合体200症例においてapo B-100遺伝子コドン3456から3553における遺伝子異常の有無をPCR-DGGE法を用いて検討した．FHホモ接合体における検討の結果，2家系において，LDL-R遺伝子エクソン17の790番目のアミノ酸リジンをコードするコドンAAGが停止コドンであるTAGへと変化する変異，K790Xを見いだした．FH患者における頻度調査の結果，この変異は20.9％と高頻度に認められ，北陸地方のFHにおける普遍的遺伝子変異 (common mutation) と考えられた．また別の1家系において，LDL-R遺伝子エクソン5の245番目のアミノ酸アスパラギン酸をコードするコドンGATがアミノ酸アスパラギンをコードするコドンであるAATへと変化する新たな変異，D245Nを見いだし，FH Nahaと命名した．この他既に報告されている2つのミスセンス変異 (W23XとP664L)，および3つのサイレント変異 (C292C, P518P, V632V) をそれぞれ見いだした．PCR-DGGE法にて異常バンドを呈した全エクソンにDNA塩基配列の変異を認めたことから本法の有用性が示唆された．apo B-100遺伝子異常についての検討では，今回対象とした領域に遺伝子変異は認められなかった．K790XおよびFH Nahaを含め，合計11種のLDL-R遺伝子変異により，北陸地方のFH患者の38.8％が説明された．一方，日本人における遺伝性高LDL-C血症の原因としてFDBは極めて低い頻度と考えられた．

Key words familial hypercholesterolemia, familial defective apolipoprotein B-100, denaturing gradient gel electrophoresis, low density lipoprotein receptor, gene mutation

近年高コレステロール血症，特に高低比重リポ蛋白コレステロール (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 血症が冠動脈硬化症発症の主原因であり，LDL-C低下療法による冠動脈硬化症の一次予防，二次予防効果が明らかにされてきた[1)2)]．

遺伝性高LDL-C血症では幼少時より高LDL-C血症が持続し，早発性冠動脈硬化症が高頻度に発症する．現在までに低比重リポ蛋白受容体 (low density lipoprotein receptor, LDL-R) およびアポリポ蛋白B-100 (apolipoprotein B-100, apo B-100) の遺伝子異常が遺伝性高LDL-C血症の原因となることが示されており[3)4)]，遺伝子レベルでこれを同定することにより遺伝性高LDL-C血症を確定診断し，早期からのコレステロール低下療法を開始することができる．

LDL-R遺伝子異常により生ずるのは家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia, FH) である[3)]．本症は幼少時期からの高LDL-C血症と，アキレス腱をはじめとする腱黄色腫[5)]，および早発性冠動脈硬化症[6)]を3主徴とし，常染色体優性遺伝形式をとる．遺伝子の変異によりLDL-Rに構造異常もしくは欠失が起こった結果[7)8)]，低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL)，および中間比重リポ蛋白 (intermediate density lipoprotein) が血中で増加する[3)]．LDL-R遺伝子の対立遺伝子の両方に異常があるホモ接合体の頻度は約100万人に1人であり，有効な治療が行われなければ平均26歳で全例が心臓死を遂げる[9)]．対立遺伝子の一方のみに異常があるヘテロ接合体は一般人500人に1人以上と極めて高頻度に存在し，若年性冠動脈硬化症の主要な原因疾患である．したがってFHを早期に確定診断し，最適な時期より治療[1)2)10)]を

平成10年9月29日受付，平成10年11月2日受理

Abbreviations：apo B-100, apolipoprotein B-100; bp, base pair; FDB, familial defective apolipoprotein B-100; FH, familial hypercholesterolemia; HDL, high density lipoprotein; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; LDL, low density lipoprotein; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; LDL-R, low density lipoprotein receptor; PCR-DGGE,

開始することが生命予後の改善につながると考えられる．特に黄色腫や家族歴が確認できない症例には，遺伝子診断が必要不可欠である．

Yamamotoら[11]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種類に上り[12]現在では400種を越えている[13]．

LDL-R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[14]を中心とした技法が用いられてきた．当科においてもKajinamiら[15)~18)]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変異が確定されたのは全症例の10数％のみであり，この方法では見い出せない数塩基対以内の小変異が残る約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[19)~23)]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．当科でも八木および東方がFHのLDL-R遺伝子変異の検索にPCR-SSCP法を導入し，5つの新たな遺伝子変異FH Tsuruga，FH Kanazawa-2，FH Nanao，FH Yokote，FH Moriokaを確定した[24)25)]．しかしこれらをあわせても北陸地区のFHのうち17.5％を説明しうるに過ぎない．以上の結果はFHにおけるLDL-R遺伝子変異の多様性を示唆するとともに，PCR-SSCP法にて遺伝子変異が突き止められない症例が数多く存在している可能性を示している．したがって，より検出力の高い遺伝子変異スクリーニング法の確立が求められている．

FH同様に遺伝性高LDL-C血症をきたすapo B-100遺伝子異常症として家族性欠陥アポB血症 (familial defective apolipoprotein B-100，FDB) がある[4]．血中のLDLは，その蛋白成分であるapo B-100がリガンドとして働いてLDL-Rと結合し，細胞内に取り込まれる．FHではLDL-R遺伝子変異により高LDL-C血症が生ずるが，一方リガンドであるapo B-100側の遺伝子変異による高LDL-C血症がFDBである．Soriaら[26]は，apo B-100の3500番目のアミノ酸においてアルギニンからグルタミンへの置換が高LDL-C血症をきたすことを明らかにした．これがFDB R3500Qである．FDBは常染色体優性遺伝形式を示す黄色腫を伴った高LDL-C血症を呈し，早発性冠動脈硬化症をきたすなど臨床像はFHと同一で，その診断はapo B-100遺伝子変異の同定によって成される．FDB R3500Qは白色人種では一般人口500人に1人とFHに匹敵する頻度で確認されている[27]．

我々は馬渕らの診断基準[28]により臨床像からFHと診断された独立した350家系を対象として，PCR-制限酵素切断多型 (PCR-restriction fragment length polymorphism，PCR-RFLP) 法によるスクリーニングを行ったが，FDB R3500Qは1例も認められなかった[29]．しかしFDBにはR3500Q以外にR3531C，R3500Wなどの報告[30)31)]があり，未知の変異も含めてR3500Q以外のapo B-100遺伝子変異が日本人遺伝性高LDL-C血症の原因となっている可能性がある．したがってapo B-100の新たな遺伝子変異を検出できるスクリーニング法の確立が必要である．

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最近報告された．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多くなされている[32)~35)]．

本研究では遺伝性高LDL-C血症を呈し臨床的にFHと診断された患者を対象としてPCR-DGGE法を用いてLDL-RおよびapoB-100遺伝子変異の検出を行い，その有用性を検討した．

対象及び方法

I．対　象

FHヘテロ接合体の診断は，馬渕らの診断基準[28]，すなわち1）血清総コレステロール (total cholesterol，TC) 230mg/dl以上で腱黄色腫を認めること，2）一親等に本症があり，TC 230mg/dl以上であること，のいずれかを満足するものとした．FHホモ接合体の診断は血清TC値，アキレス腱黄色腫の程度，家系調査などの臨床像から行った．これらFH症例を以下の3つに分け，それぞれの検討の対象とした．

1．臨床診断されたFHホモ接合体5症例 (表1) におけるLDL-R遺伝子変異の検討

2．臨床診断されたFHヘテロ接合体160家系200症例におけるapo B-100遺伝子コドン3456から3553における遺伝子変異の検討

Table 1. Clinical data of the patints with homozygous familial hypercholestrolemia

Patient (Initial)	Age (year)	Sex	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	ATT (mm)	IHD	Consanguinity
M.T.	36	M	589	96	28	Thick	PTCA	No
M.M.	42	M	500	291	28	Thick	CABG	No
Y.S.	34	F	535	98	20	Thick	−	No
C.K.	13	F	584	115	31	Not thick	−	No
H.Y.	50	F	533	229	24	Thick	CABG	No

M, male; F, female; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; ATT, Achilles tendon thickness on X-ray film; Thick, equal to or more than 9 mm; Not thick, less than 9 mm; IHD, ischemic heart disease; −, load negative; PTCA, percutaneous transluminal coronary angioplasty; CABG, coronary artery bypass grafting; No, no cansanguinity.
All values were obtained during pre-treatment period.

PCR-denaturing gradient gel electrophoresis; PCR-RFLP, PCR-restriction fragment length polymorphism; PCR-SSCP, PCR-single strand comformational polymorphism; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; Tm, midpoint temperature

Table 2. Oligonucleotides flanking exons of the LDL-receptor gene for PCR amplification

Exon	Oligonucleotide name	Sequence
LDL-R		
Promoter	PR-5	5'*-AGG ACT GGA GTG GGA ATC AGA GC-3'
	PR-3	5'-TGC TGT GTC CTA GCT GGA AAC CC-3'
1	EX1-5	5'#-TTG AAA TGC TGT AAA TGA TGA CGT GG-3'
	EX1-3	5'-CTG GCG CCT GGA GCA AGC-3'
2	EX2-5	5'*-CGT GGT CAG TTT CTG ATT CTG GCG-3'
	EX2-3	5'-ATA AAT GCA TAT CAT GCC CAA AGG-3'
	SP57	5'-CCT TTC TCC TTT TCC TCT CTC TGA G-3'
	SP58	5'-AAA ATA AAT GCA TAT CAT GCC CAA A-3'
3	EX3-5	5'*-TCG GCC TCA GTG GGT CTT TC-3'
	EX3-3	5'-ACT CCC CAG GAC TCA GAT AGG C-3'
4	EX45-5	5'*-ACT GCG GCA GCG TCC CCG GC-3'
	EX45-3	5'-GGA TGC AGG TGG AGC TGT TGC-3'
	EX43-5	5'-ACC TGT GGT CCC GCC AGC-3'
	EX43-3	5'*- CCA GGG ACA GGT GAT AGG ACG-3'
5	EX5-5	5'*-GGC CCT GCT TGT TTT TCT CTG G-3'
	EX5-3	5'-AGC AGC AAG GCA CAG AGA ATG G-3'
	SP62	5'-CAA CAC ACT CTG TCC TGT TTT CCA G-3'
	SP63	5'-GGA AAA CCA GAT GGC CAG CGC TCA C-3'
	Ex5MM	5'-GAA TAT GAC TGC AAG GAC ATG ATC-3'
6	EX6-5	5'*-ACG AAA CTG AGG CTC AGA CAC ACC-3'
	EX6-3	5'-GCT CCC CAC AAA CTC TGC AAG C-3'
	SP64	5'-TCC TTC CTC TCT CTG GCT CTC AGA G-3'
	SP65	5'-GCA AGC CGC CTG CAC CGA GAC TCA C-3'
7	EX7-5	5'*-AGA GTG ACC AGT CTG CAT CCC TGG-3'
	EX7-3	5'-TTG GTT GCC ATG TCA GGA agc-3'
8	EX8-5	5'*-TCC CCA CCA AGC CTC TTT CTC TC-3'
	EX8-3	5'-CCA CCC GCC GCC TTC C-3'
9	EX9-5	5'**-CTG ACC TCG CTC CCC GGA CC-3'
	EX9-3	5'-GGC TGC AGG CAG GGG CGA CG-3'
10	EX10-3	5'*-CCT GCA GCC CTC AGC GTC G-3'
	EX10-5	5'-GCA GTG AGA TGA GGG CTC CTG G-3'
11	EX11-5	5'*-GGA TCC TCC CCC GCC CTC-3'
	EX11-3	5'-TGG CTG GGA CGG CTG TCC-3'
	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	EX12-5	5'-GGC CCT CAG GCC CTC TGG-3'
	EX12-3	5'*-CCG AGT TTT CTG CGT TCA TCT T-3'
13	EX13-5	5'#-GTC ATC TTC CTT GCT GCC TG-3'
	EX13-3	5'-CAC AAG GAG GTT TCA AGG TTG G-3'
	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	EX14-5	5'#-TCT CGT TCC TGC CCT GAC TCC-3'
	EX14-3	5'-GAC ACA GGA CGC AGA AAC AAG G-3'
	Oligo1	5'-CCT GAC TCC GCT TCT TCT GCC-3'
	Oligo2	5'-CCA CAC CTG TGA GGC AGC TCC-3'
15	EX15-5	5'***-GGC ACG TGG CAC TCA GAA GAC G-3'
	EX15-3	5'#-GTG TGG TGG CGG GCC CAG TC-3'
16	EX16-5	5'#-CTC CAT TTC TTG GTG GCC TTC C-3'
	EX16-3	5'-CAT AGC GGG AGG CTG TGA CCT GG-3'
17	EX17-5	5'#-GGG CAG CTG TGT GAC AGA GCG-3'
	EX17-3	5'-CAT GGC TCT GGC TTT CTA GAG AGG-3'
	SP86	5'-TGA CAG AGC GTG CCT CTC CCT ACA G-3'
	SP87	5'-TGG CTT TCT AGA GAG GGT CAC ACT C-3'
	Ex17MM	5'-TGA TGT TCT TAA GCC GCC AGT TGT-3'
18	EX18-5	5'#-CCT GAG TGC TGG ACT GAT AGT TTC C-3'
	EX18-3	5'-AAG GCC GGC GAG GTC TCA GG-3'
ApoB	APOB-5	5'*-GGA GCA GTT GAC CAC AAG CTT AGC-3'
	APOB-3	5'-GGT GGC TTT GCT TGT ATG TTC TCC-3'

\# 50 bp GC clamp 5'-CGC CCG CCG CCG CCC GCC GCG CCC CGC GCC CGT CCC GCC GCC CCC GCC CG-3'

* 40 bp GC clamp 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-3'

** 46 bp GC clamp/10 bp AT clamp 5'-CGC CCG CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CG CCC CCG CCC GAA ATA ATA AA-3'

*** 3 bp GC clamp 5'-CGG-3'

Oligonucleotides complementary to DNA sequences flanking exons of the human LDL receptor gene and apolipoprotein B-100 gene were synthesized on ABI 380A DNA synthesizer and used to amplify the intervening sequences with polymerase chain reaction.

3. 独立した201家系のFHヘテロ接合体におけるLDL-R遺伝子変異の頻度の検討

Ⅱ. 方 法

1. 高分子DNA抽出

対象者の末梢静脈血10mlをEDTA-2Naを抗凝固剤として採取し4℃にて移送，－20℃にて保存した．この末梢血を室温にて解凍後トライトンX-100融解変法[36]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 $MgCl_2$，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 (Sigma，St. Louis，USA) にて消化後，フェノールークロロホルム (1：1) で1回，続いてクロロホルムー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

Nissenら[37]の報告を参考に，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遺伝子配列から，18エクソンすべておよびプロモーター領域についてDGGE法にて効率的な変異検出を可能とする解離温度 (midpoint temperature，Tm) となるよう設計したプライマー計20組を作成した (表2)．Tm値の解析にはMacMelt™ソフトウェア (Bio-Rad Laboratories，Richmond，USA) を使用した．一つのエクソンに対するプライマー一組のいずれかの5' 末端に40塩基対 (base pair，bp) から50bpのGC繰り返し配列から成るGCクランプをつけた．スプライス部位の変異検出のため各プライマーはエクソンに隣接するイントロンを少なくとも5塩基含むものとした．変異の検出効率を上げるためエクソン4は2つに分割した．

apo B-100遺伝子については，これまでFDBとして報告されている遺伝子変異がエクソン26の3500番目のアミノ酸周辺に限られていることから，3456から3553番目を評価できるようにプライマーを設定した[37]．陽性コントロールとしては，apo B-100遺伝子10708番目の塩基がGからAに変異したFDB R3500Q (Dr. Illingworth，Oregon Health Sciences University，より供与) および10800番目の塩基がCからTに変異したFDB R3531C (Dr. Pullinger，University of California，San Francisco，より供与) を用いた．

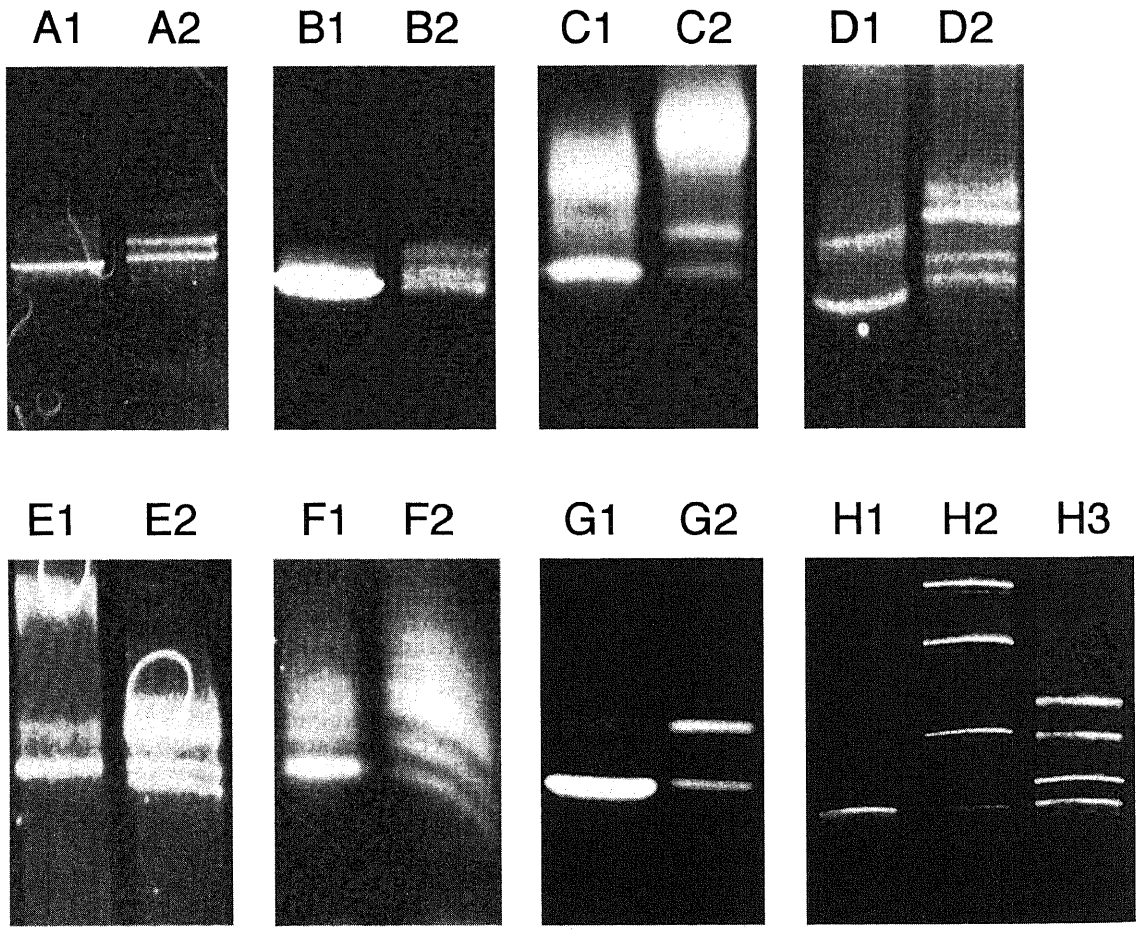

Fig. 1. Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) analysis in the exon 2, 5, 6, 11, 13, 14 and 17 of low density lipoprotein-receptor (LDL-R) gene and the codon 3500 region of the apolipoprotein B-100 gene. A1, LDL-R exon 2, normal control; A2, LDL-R exon 2, proband M.M.; B1, LDL-R exon 5, normal control; B2, LDL-R exon 5, proband C.K.; C1, LDL-R exon 6, normal control; C2, LDL-R exon 6, proband H.Y.; D1, LDL-R exon 11, normal control; D2, LDL-R exon 11, proband M.T.; E1, LDL-R exon 13, normal control; E2, LDL-R exon 13, proband M.M.; F1, LDL-R exon 14, normal control; F2, LDL-R exon 14, proband M.T.; G1, LDL-R exon 17, normal control; G2, LDL-R exon 17, proband M.T.; H1, apolipoprotein B-100 codon 3500 region, normal control; H2, apolipoprotein B-100 codon 3500 region, R3531C; H3, apolipoprotein B-100 codon 3500 region, R3500Q.

プライマーはDNA合成機モデルABI381A (Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA) を用いベータ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，0.01％ゼラチンを含む緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$) に加え再滅菌蒸留水を計50μlとなるように加え撹拌した．遠心して反応液を集め50μlのミネラルオイル (Sigma) を滴下して蒸発を防ぎ，95℃5分の後，94℃1分，66℃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40サイクルの反応を行い，さらに変性および再結合[37]のため99℃7分，65℃60分，37℃60分の反応を1サイクル行った．

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た．

3. PCR-DGGE法

PCR産物をTris－酢酸－EDTA緩衝液で満たした温度を60℃で厳密に調節可能な専用恒温槽 (Bio-Rad Laboratories) を使用し10％ポリアクリルアミドゲルで140V 360分間泳動した．10％ポリアクリルアミド変性剤濃度勾配ゲルは変性剤を含まない変性剤濃度0％溶液と変性剤濃度80％溶液 (変性剤濃度100％では，尿素7Mと40％ホルムアミドを含む) を用意し，エクソンにより濃度勾配30％から70％，もしくは40％から80％と電気泳動される方向と平行に低濃度から高濃度となるように，濃度勾配ゲル作成ミキサー (Bio-Rad Laboratories) を用いて作成した．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．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)

自動化直接塩基配列決定法としてABI PRISM™ 377 DNAシーケンサー (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, USA) を用いた．GCクランプを含まないプライマー (表2) を用いて反応を行った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100－150μlを加え2000回転30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，それを直接塩基配列決定法用の鋳型DNAとした．これにダイ・ターミネーター・サイクル・シーケンシング・キット (Perkin-Elmer Corporation) を用いダイ・ターミネーター法にて反応を行った．4％ポリアクリルアミドゲルアクリルアミド・ビス (19：1) を用い，泳動用緩衝液は1 x Tris－ホウ酸－EDTA泳動用緩衝液を用い，室温のもと1680V 7時間かけて泳動した．泳動は1.25秒毎にレーザービームによって読みとり，パーソナルコンピューターPower Macintosh 7200/120 (Apple, Cupertino, USA) 本体内蔵の固定ディスクに数値データとして保存された．反応終了後に塩基配列解析を自動的に行い，配列を文字データおよび波形のグラフとして出力した．

5. 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 (表2)．一側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

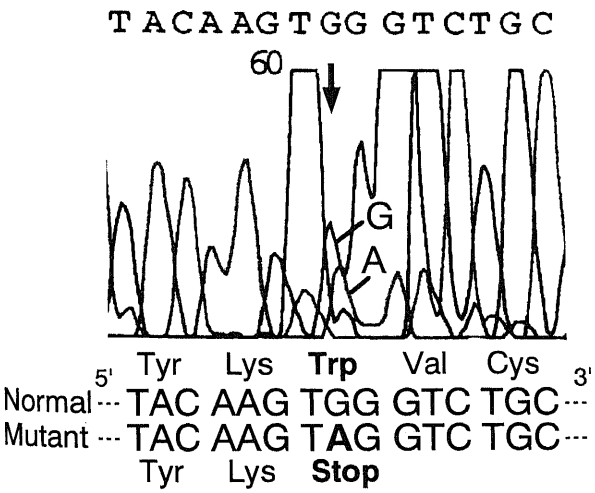

Fig. 2. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 2 of LDL-receptor gene. Each curve indicates adenine (A), cytosine (C), guanine (G) and thymine (T). The graph is the result of proband M.M. The arrow indicates A peak of the mutant and G peak of the wild type.

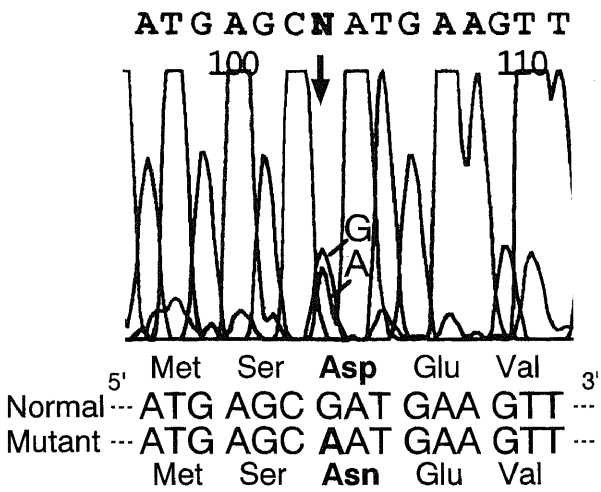

Fig. 3. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 5 of LDL-receptor gene. The graph is the result of proband C.K. The arrow indicates A peak of the mutant and G peak of the wild type.

合体とヘテロ接合体との鑑別を行った．

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，TC，トリグリセライド (triglyceride，TG) は酵素法で測定した[40)41)]．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[42)]．LDL-CはFriedewaldの式[43)]で算出した．

成　　績

I．LDL-R遺伝子解析

1．PCR-DGGEの結果

FHホモ接合体5症例に対するPCR-DGGE法による検討の結果，図1に示すようにLDL-R遺伝子エクソン2，5，6，11，13，14，17において異常バンドが認められた．異常バンドが認められたエクソンについては，引き続き直接塩基配列決定法による変異の同定を行った．

2．エクソン2塩基配列の決定

1）PCR-DGGE法による異常バンドの検出

PCR-DGGE法によるスクリーニングで，FHホモ接合体M.M.のLDL-R遺伝子エクソン2において異常バンドが検出された．

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.M.のLDL-R遺伝子エクソン2における塩基配列解析の結果，23番目のトリプトファンをコードするTGGがTAGへと変異し，停止コドンとなる変異のヘテロ接合体であった(図2)．

3．エクソン5塩基配列の決定

1）PCR-DGGE法による異常バンドの検出

FHホモ接合体C.K.のLDL-R遺伝子エクソン5において異常バンドが検出された．

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C.K.のLDL-R遺伝子エクソン5における塩基配列解析の結果を図3に示した．正常者においてGのバンドのみ認められる位置に，本例ではAとG両方のバンドが観察され，LDL-R 245番目のアスパラギン酸をコードするGATがAATへと変化し，アスパラギンに置換される変異 (D245N) のヘテロ接合体であった．これまで報告のない新たな変異であり，発端者の出身地によりFH Naha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

プライマーEx5MMおよびSP63の組み合わせによるPCR産物は，遺伝子変異がある場合のみ制限酵素*Bcl* Iにより切断される (図4)．図5に発端者C.K.の家系図とPCR-RFLP法よる変異の確認結果を示した．発端者とその妹および母親に正常バンドと切断されたバンドの両方が確認され，同変異のヘテロ接合体であると診断された．

4）同変異での血清脂質値および臨床像の検討

発端者C.K.は沖縄県出身の13才女性．両親に血族結婚なし．TC 584mg/dl，TG 115mg/dl，HDL-C 31mg/dlであった．

4．エクソン6塩基配列の決定

FHホモ接合体H.Y.のLDL-R遺伝子エクソン6に異常バンドが認められた．直接塩基配列決定法にてC292C (TGCからTGT

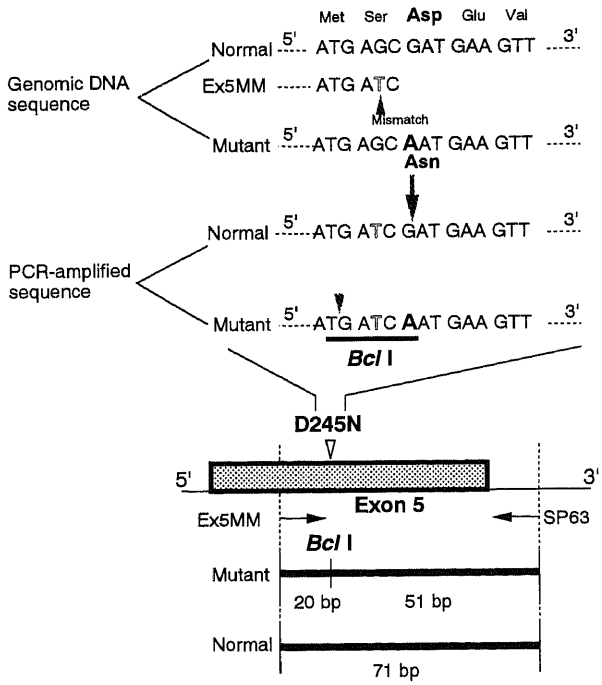

Fig. 4. Rapid detection method for an exon 5 missense mutation (D245N) employing the mutagenic primer-mediated restriction map modification. Using a mutagenic primer Ex5MM and a reverse primer SP63, gene amplification by PCR introduced an artificial *Bcl* I site in the PCR product only for the G to A mutated allele (D245N). Digestion of the PCR products with *Bcl* I generates polymorphic restriction fragments of 71 bp and/or 51 bp. Heterozygotes show double band of 71 bp and 51 bp.

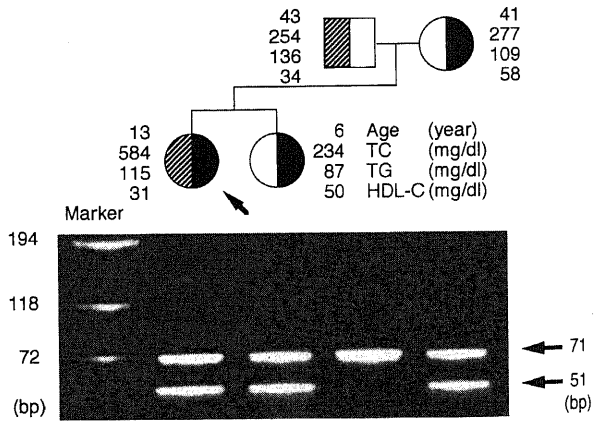

Fig. 5. The pedigree and result of PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of C.K. family. The arrow in the pedigree indicates the proband. Digestion of the PCR products with *Bcl* I generates polymorphic restriction fragments of 71 bp and/or 51 bp. The proband, her mother and sister show 71 bp and 51 bp fragments, which indicate the heterozygotes for FH Naha mutation (D245N). Her father doesn't show 51 bp fragment. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. ◑, heterozygous patient with FH Naha; ▨, heterozygous patient with unknown mutant; ◍, compound heterozygous patient with FH Naha 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. Marker, the molecular size marker of ϕ X174 double strand DNA digested with *Hae* III.

への変異，どちらもシステイン）のサイレント変異であることが確認された（図6）．

5．エクソン11塩基配列の決定

FHホモ接合体M.T.およびY.S.のLDL-R遺伝子エクソン11に同一パターンの異常バンドが認められた．直接塩基配列決定法によりP518P（CCCからCCT，どちらもプロリン）のサイレント変異であることが確認された（図7）．

6．エクソン13塩基配列の決定

FHホモ接合体M.M.およびH.Y.のLDL-R遺伝子エクソン13に同一パターンの異常バンドが認められた．直接塩基配列決定法によりV632V（GTCからGTT，どちらもバリン）のサイレント変異であることが確認された（図8）．

7．エクソン14塩基配列の決定

1）PCR-DGGE法による異常バンドの検出

FHホモ接合体M.T.のLDL-R遺伝子エクソン14において異常バンドが検出された．

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.T.のLDL-R遺伝子エクソン14における塩基配列解析の結果，664番目のプロリンをコードするCCGがCTGへと変異し，ロイシンとなる変異のヘテロ接合体であった（図9）．

8．エクソン17塩基配列の決定

1）PCR-DGGE法による異常バンドの検出

FHホモ接合体M.T.およびY.S.のLDL-R遺伝子エクソン17に異常バンドが検出された．

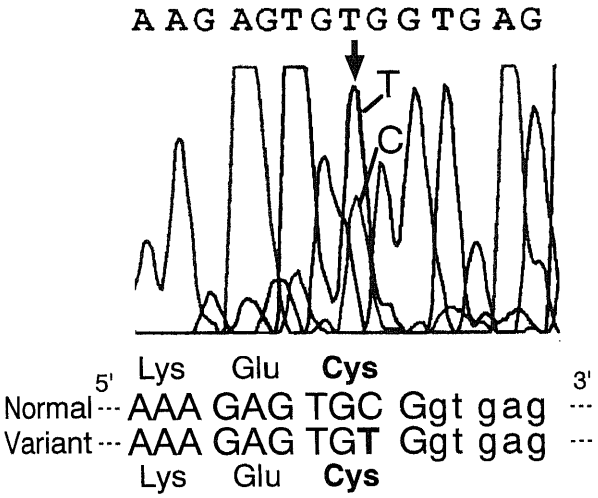

Fig. 6. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 6 of LDL-receptor gene. The graph is the result of proband H.Y. The arrow indicates T peak of the variant and C peak of the wild type.

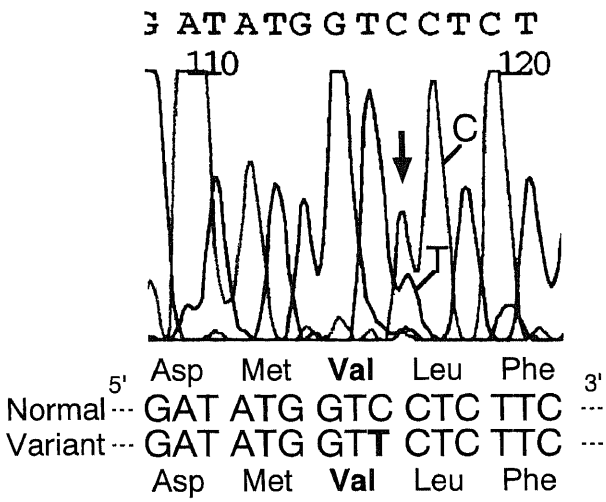

Fig. 8. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 13 of LDL-receptor gene. The graph is the result of proband M.M. The arrow indicates T peak of the variant and C peak of the wild type.

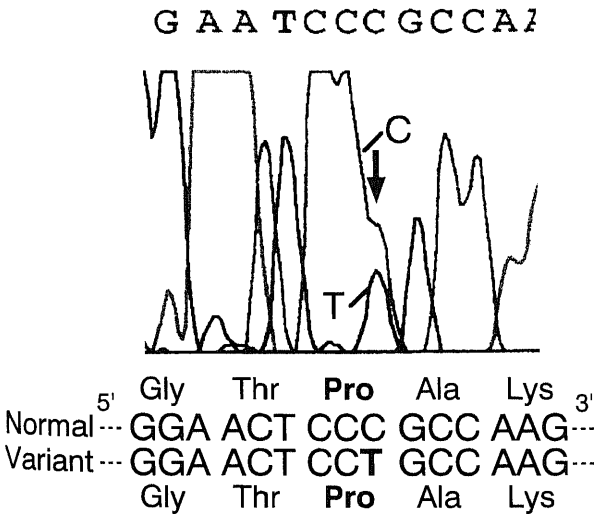

Fig. 7. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 11 of LDL-receptor gene. The graph is the result of proband M.T. The arrow indicates T peak of the variant and C peak of the wild type.

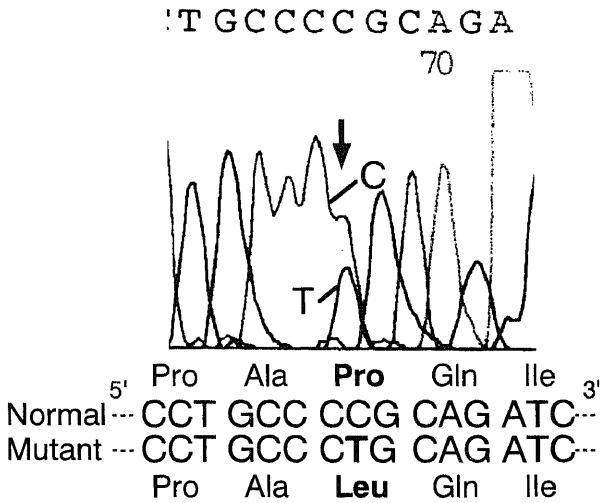

Fig. 9. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 14 of LDL-receptor gene. The graph is the result of proband M.T. The arrow indicates T peak of the mutant and C peak of the wild type.

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.T.のLDL-R遺伝子エクソン17における塩基配列解析の結果を図10に示した．正常者においてAのバンドのみ認められる位置に，本例ではAとT両方のバンドが観察され，LDL-R 790番目のリジンをコードするAAGがTAGへと変化し，停止コドンとなる変異 (K790X) のヘテロ接合体であった．

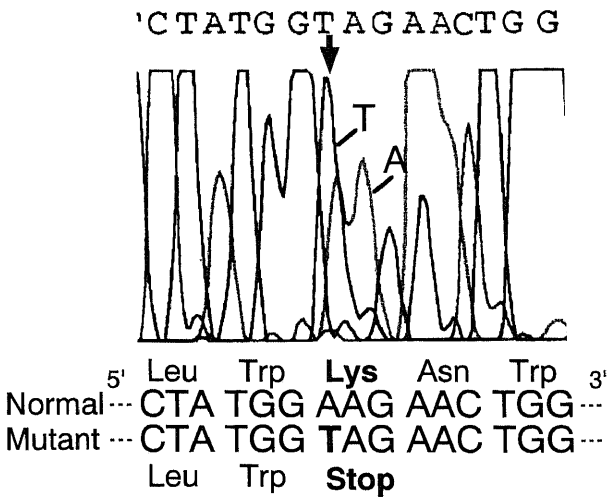

Fig. 10. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 17 of LDL-receptor gene. The graph is the result of proband M.T. The arrow indicates T peak of the mutant and A peak of the wild type.

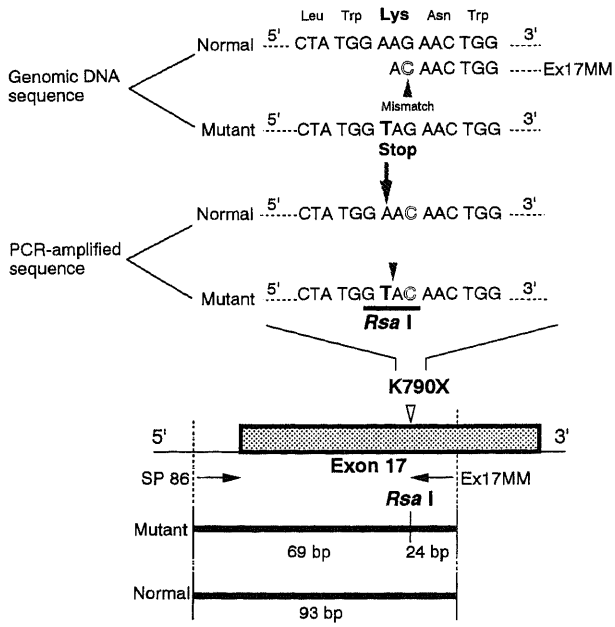

Fig. 11. Rapid detection method for an exon 17 missense mutation (K790X) employing the mutagenic primer-mediated restriction map modification. Using a mutagenic primer Ex17MM and a primer SP63, gene amplification by PCR introduced an artificial *Rsa* I site in the PCR product only for the A to T mutated allele (K790X). Digestion of the PCR products with *Rsa* I generates polymorphic restriction fragments of 93 bp and/or 69 bp. Heterozygotes show double band of 93 bp and 69 bp.

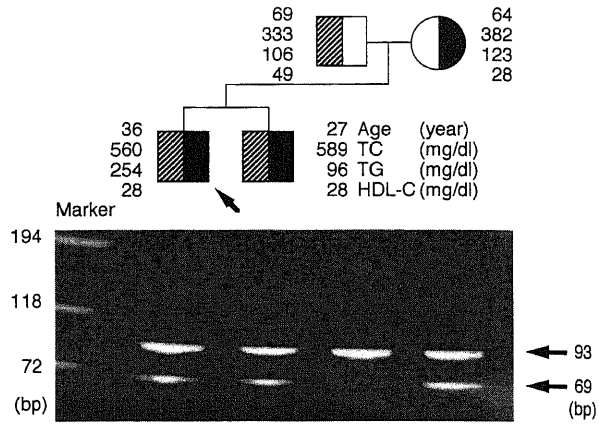

Fig. 12. The pedigree and result of PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of M.T. family. The arrow in the pedigree indicates the proband. Digestion of the PCR products with *Rsa* I generates polymorphic restriction fragments of 93 bp and/or 69 bp. The proband, his mother and brother show 93 bp and 69 bp fragments, which indicate the heterozygotes for K790X mutation. His father doesn't show 69 bp fragment. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. ◑, heterozygous patient with K790X; ▨, heterozygous patient with FH Kanazawa-2 (P664L); ▨, compound heterozygous patient with K790X and FH Kanazawa-2; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; All values were obtained at the age showed in the pedigree. Marker, the molecular size marker of ϕ X174 double strand DNA digested with *Hae* Ⅲ.

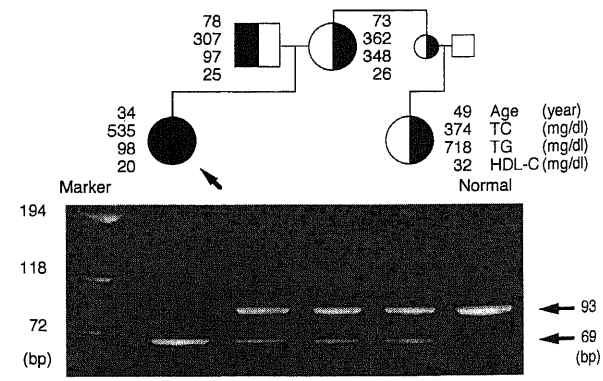

Fig. 13. The pedigree and result of PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of Y.S. family. The arrow in the pedigree indicates the proband. Digestion of the PCR products with *Rsa* I generates polymorphic restriction fragments of 93 bp and/or 69 bp. The proband shows only 69 bp fragment, which indicate the homozygotes for K790X mutation. Her mother, father and cousin show 93 bp and 69 bp fragments, which indicate the heterozygotes for K790X mutation. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. ◑, heterozygous patient with K790X; ●, homozygous patient with K790X; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; All values were obtained at the age showed in the pedigree. Marker, the molecular size marker of ϕ X174 double strand DNA digested with *Hae* Ⅲ.

3) PCR-RFLP法による発端者家系内での変異の確認

プライマーSP86およびEx17MMの組み合わせによるPCR産物は，K790X遺伝子変異がある場合のみ制限酵素*Rsa* Iにより切断される（図11）．図12に発端者M.T.の家系図とPCR-RFLP法よる変異の確認結果を示した．発端者とその兄および母親に正常バンドと切断されたバンドの両方が確認され，同変異のヘテロ接合体であると診断された．発端者M.T.は父方よりLDL-R遺伝子変異P664L (FH Kanazawa-2) を遺伝していることが確認されている症例であり，今回の検討により，K790Xを併せ持つ複合ヘテロ接合体であることが確診された．

別家系（発端者Y.S.）の家系図とPCR-RFLP法による変異の確認結果を図13に示した．発端者Y.S.は切断されたバンドのみ，その両親は正常バンドと切断バンドの両方が確認され，発端者はK790X遺伝子変異を両親からそれぞれ受け継いだホモ接合体であることが確認された．

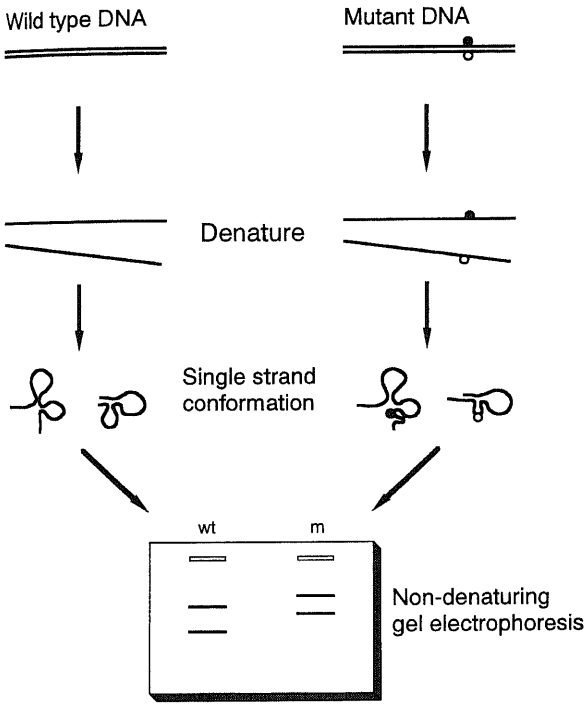

Fig. 14. The principal of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). Wild type (wt) and mutant (m) PCR products are shown at the top. The presence of a point mutation is represented by a dot on the DNA strands. Different single stranded conformation lead to differential mobility in the gel.

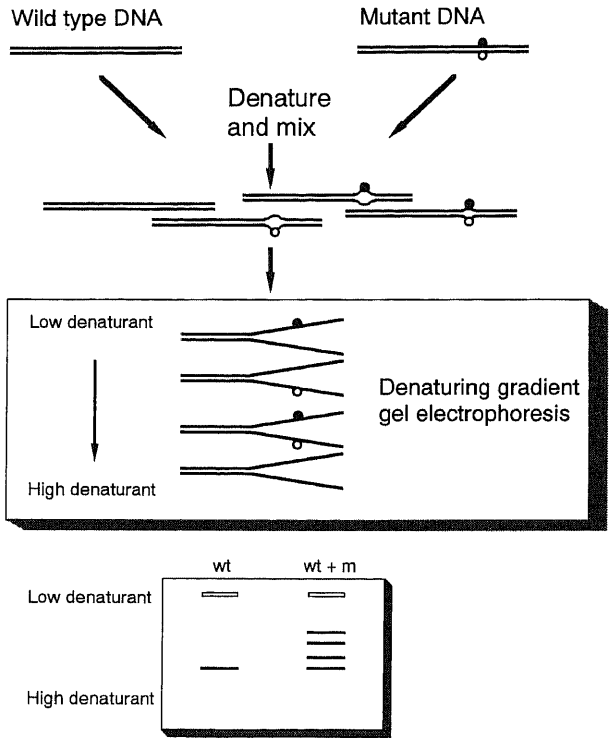

Fig. 15. The principal of PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). Wild type (wt) and mutant (m) PCR products are denatured and reannealed to generate 4 species of hetero- and homoduplexes. Differential melting behavior leads to altered migration in a gradient of denaturing agents compared to wild type homoduplex.

Table 3. Frequencies of LDL-receptor gene mutations in Hokuriku district according to screening studies of 201 FH families

Name 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 (exon 6)	1	0.5
FH Kanazawa-2	P664L (exon 14)	6	3.0
FH Morioka	R395W (exon 9)	1	0.5
FH Yokote	Q718X (exon 15)	1	0.5
FH Nanao	W23X (exon 2)	2	1.0
FH Naha	D245N (exon 5)	1	0.5
K790X	K790X (exon 17)	42	20.9
Total		78	38.8

4）同変異での血清脂質値および臨床像の検討

発端者M.T.は金沢市出身の36才男性，両親に血族結婚はない．兄弟ともP664LおよびK790Xの複合ヘテロ接合体である．血清脂質値はTC 589mg/dl，TG 96mg/dl，HDL-C 28mg/dlで既に狭心症を発症しており，現在週2回のLDLアフェレーシスにより治療されている．

もう一人の発端者Y.S.は，鳥越村出身の34才女性，両親に血族結婚はない．血清脂質値はTC 535mg/dl，TG 98mg/dl，HDL-C 20mg/dlで現在LDLアフェレーシスにより治療されている．

9．K790Xの頻度調査

前項で使用したPCR-RFLP法を用い，北陸地方の独立したFH 201家系を対象とし本遺伝子変異を頻度調査を行った結果，42家系（20.9％）に同変異を確認した．

Ⅱ．apo B-100遺伝子解析

1．PCR-DGGEの結果

未知の変異も含めてR3500Q以外のapo B-100遺伝子変異が日本人遺伝性高LDL血症の原因となっている可能性があり，臨床的に診断されたFH 160家系200症例を対象とし，PCR-DGGE法を用いてコドン3500周辺の変異を検討した．結果は，スクリーニング対象とした200症例中にはapo B-100遺伝子変異は認められなかった（図1）．

考　　察

FHの原因となるLDL-R遺伝子異常は，現在までに400種以上が報告されているが，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，点変異が多数を占めている．LDL-R遺伝子は18エクソン，およそ45kbpと比較的大きく，FHの日常的な診断に全エクソンを塩基配列決定することは効率の面で手間がかかりすぎるといえる．PCR-RFLP法は特定の限られた変異のみ検出する方法であるから，変異の確定あるいは頻度調査には威力を発揮するが，未知の遺伝子変異のスクリーニングには有効ではない．

未知の点変異の検出方法として現在用いられる方法には，PCR-SSCP法，ヘテロデュプレックス（heteroduplex）法，PCR-クリーバーゼⅠ切断多型（PCR-Cleavase Ⅰ fragment length polymorphism）法，PCR－化学的不一致切断（PCR-chemical mismatch cleavage）法，さらに今回検討したPCR-DGGE法などがある．この中ではPCR-SSCP法が従来は広く用いられてきた．

一本鎖DNAはその塩基配列に依存した高次構造をとる．その構造は一塩基の置換や，欠失挿入といったわずかな違いにより多型をとり，この現象をSSCPと呼ぶ．この高次構造の違いはゲル電気泳動における移動度の差として検出できることが多く，PCR産物を変性して一本鎖として電気泳動し，これにより突然変異を検出するのがPCR-SSCP法である（図14）[44]．

PCR-SSCP法は比較的簡便な器具で行うことが可能でありながら遺伝子変異の検出力は80％とかなり高く，250bp程度のDNA断片で効率よく遺伝子変異を検出できる[44]．正常の一本鎖のバンドは2本，異常遺伝子のヘテロ接合体では通常4本のバンドが出現する．本法は現在までに最も汎用される遺伝子変異検出法で，当科においても八木，東方がPCR-SSCP法を用いてLDL-R遺伝子をスクリーニングし，5つの新たな遺伝子変異FH Tsuruga，FH Kanazawa-2，FH Nanao，FH Yokote，FH Moriokaを確定した[24)25)]．

しかし本法にもいくつかの問題点が指摘されている．まずPCR-SSCP法では，温度，pH，塩濃度などDNAの高次構造に影響する条件が多く，複数の変異をひとつの泳動条件で検出できない場合がある．したがって，未知の遺伝子変異の場合は，ひとつの泳動条件でのスクリーニングで十分とはいえないことになる．また一旦最適化された泳動条件下でも検出漏れがあったとの報告[34]もある．

DGGE法は1983年にFischerら[45]により発表された．二本鎖DNAは，温度もしくは変性剤濃度上昇につれ二重らせん構造から部分融解を経て完全に一本鎖へと解離するが，塩基配列により解離温度が決定されることから変異を検出する（図15）．完全に解離するその直前の範囲の変異は検出できないが，Sheffieldら[46]は40－50bpのGCばかりの配列（GC－クランプ，GC-clamp）をPCR産物の一端に付加することでこれを解決した．2本鎖DNAは塩基配列に依存した解離温度を持ち，塩基配列の違いが解離温度の違いすなわち解離する変性剤濃度の違いとなる．PCR産物は，徐々に変性剤濃度の上昇するゲル電気泳動において，塩基配列に応じた変性剤濃度の部位で部分解離を起こす．部分解離すると泳動速度が極端に低下するため塩基配列の違いが泳動停止位置の違いとして検出される．正常の遺伝子では1本のバンド，ヘテロ接合体では通常4本のバンドが出現する．ゲル電気泳動は厳密に温度調節のできる恒温槽にて行う．温度は通常60℃で一定にし，濃度勾配のみを目的の塩基配列に応じて決める．PCR産物は600bpまでは検出に適し，検出率は95％とされる[44]．SSCP法は高次構造の変化が微妙であるのに対し，DGGE法は塩基配列により決定される解離温度の検出であり再現性が高いことも特徴とされる．

DGGE法ではプライマーを設計する時点で塩基配列による解離温度を解析して，適切な側にGC－クランプをつけ，増幅範囲を決定する必要がある．またGC－クランプがついているため，PCRの条件設定が難しい場合があるが再現性は良好である．温度管理のできる恒温槽が必要であり，また濃度勾配をつけたゲルを準備する必要がある．

PCR-DGGE法を用いた検討において，今回我々はLDL-R遺伝子W23X，D245N，C292C，P518P，V632V，P664L，およびK790Xの4種のアミノ酸変異と3種のサイレント変異を検出した．このうちLDL-R遺伝子W23Xは以前当科においてPCR-SSCP法によるスクリーニングにより見出されたFH Nanaoと同一の変異であった[25]．LDL-R 245番目のアスパラギン酸では，これまでGATがGAA（グルタミン酸）となるFH Cincinnati-1[12]が報告されているが，D245Nはこれとは異なる新たな変異である．LDL-R遺伝子C292Cはエクソン6最後から2番目の塩基の変異であるが，同部位のコンセンサス・シークエンスにおけるシトシンおよびチミンの出現頻度はそれぞれ12％および15％であり[47]，スプライシングに関与する可能性は低いと思われ，疾患発症にはつながらないものと考えられた．LDL-R遺伝子P518PはYamakawa-Kobayashiら[48]がPCR-SSCP法により新しい遺伝子多型として報告しているものと同一であった．LDL-R遺伝子V632Vは制限酵素*Ava*Ⅱで検出されるRFLPとして知られている遺伝子多型であった[49]．LDL-R遺伝子P664Lは以前当科においてPCR-SSCP法によるスクリーニングにより見出されたFH Kanazawa-2と同一の変異であった[24]．LDL-R遺伝子K790XはMaruyamaら[50]が報告した変異と同一であった．

今回我々が北陸地方におけるFHの約20％に見出したLDL-R遺伝子K790X変異は，PCR-SSCP法によるスクリーニングでは検出されておらず，今回PCR-DGGE法によりはじめて異常バンドとして検出された．これまでPCR-SSCP法とPCR-DGGE法を比較したいくつかの検討が行われているが，PCR-SSCP法で検出できなかった変異をPCR-DGGE法が検出したとの報告が多い[32)~35)]．また今回検討したapo B-100遺伝子領域ではFDB R3531Cなど，もともとPCR-SSCP法で検出された変異であるにもかかわらず，その後の前向き研究でPCR-SSCP法では偽陰性となりPCR-DGGE法でようやく検出されたとの報告[34)]もされている．

今回のPCR-DGGE法によるスクリーニングにおいては，異常バンドがみられたときは全例何らかの塩基置換が見出されており，偽陽性はみられなかったことも本法の利点のひとつとできるものと思われる．

これまでFHにおいては孤立した環境で増加した集団において，共通の祖先から受け継いだ遺伝子変異が高頻度に集積するいわゆる創始者効果 (founder effect) がいくつか報告されている[3)51)~65)]．

日本人はほぼ単一の民族で構成されており，地理的歴史的背景から国外との交流はかなり制限されてきた．したがって日本人FHに創始者効果がみられるかどうかに関心が持たれてきたが，これまでのところ，高頻度に集積する変異は確認されていなかった．

今回の研究における頻度調査で北陸地方の独立したFH 201家系中42家系 (20.9％) にK790X変異を確認した．日本国内で報告されている遺伝子変異ではこれまでMaruyamaら[50)]が関西地方を主とした調査でイントロン12の1845+2T→C変異が13.3％で最も頻度が高かったが，これよりもさらに高い頻度であり，普遍的遺伝子変異 (common mutation) といってよい．K790Xはこれまで日本国内でのみ報告されている変異であり，特に北陸で頻度が高いことから創始者が北陸出身である可能性がある．今後ハプロタイプの検討が必要である．

FHにおいては，その遺伝子変異ごとに，その臨床像に一定の特徴がみられることが示されているが，K790X変異ヘテロ接合体の平均血清脂質値 (n＝39) はTC 340mg/dl, TG 158mg/dl, HDL-C 42mg/dlであり，これまで示されている日本人FH患者の平均血清コレステロール値にほぼ一致する結果であった[66)]．しかしTGはやや高値をとる傾向にあり，今後症例を重ねさらに検討する必要がある．

今回の検討により確認されたK790XおよびFH Nahaを含め，合計11種のLDL-R遺伝子変異により，北陸地方のFH患者の38.8％が説明された (表3)．

今回の検討で，PCR-DGGE法によりapo B-100遺伝子コドン3456～3553をスクリーニングしたが，遺伝子変異は認められず，FDBは日本人の遺伝性高LDL-C血症の原因としては稀であると考えられた．FDBの分布および頻度には，人種的地理的な偏りが非常に強い．白色人種ではFHに匹敵する頻度である[27)]のとは対照的に，フィンランド[67)]，イスラエル[68)]，旧ソ連[69)]などでは見つからなかったと報告されている．ほとんどのFDBはR3500Qであり，しかもほぼすべての症例で比較的稀な同一のapo B-100遺伝子ハプロタイプを持つことから，一人のコーカサス人発端者に生じた遺伝子変異が広く受け継がれたものと解釈されている[70)]．今回の検討で日本人においてFDBが見つからなかったことは，上記のようにFDBは非常に人種差のある疾患であることを裏付けているといえる．

しかし，アジア人種で低い頻度ながらFDB R3500Wが報告されており[71)72)]，なんらかのapo B-100遺伝子変異が日本人遺伝性高LDL-C血症の原因となっている可能性はある．またFDBの原因遺伝子変異の全てがコドン3500周辺であることから，スクリーニングの試みのほとんどはコドン3500周辺で行われてきたが，apo B-100蛋白のLDL-Rとの実際の結合領域はコドン3500よりもかなり上流に存在することがごく最近報告された[73)]．現在のところこの領域における遺伝子変異で高LDL-C血症をきたしたとする報告はないが，今後十分に検討すべき領域と思われる．

今回の検討ではPCR-DGGE法の導入により，PCR-SSCP法では検出されなかったLDL-R遺伝子変異を検出できたが，検討したFHホモ接合体5例のうち，M.M.およびC.K.は対立遺伝子の一方の変異がまだ確認されておらず，H.Y.はサイレント変異のみが検出されたにとどまっている．近年の遺伝子解析から，エクソン－イントロン接合部だけではなく，30bpも離れたイントロンの投げ縄配列 (ラリアット・シークエンス) の遺伝子変異がスプライシングの異常をきたすことがLDL-Rでも報告されている[74)]．このように今回検討を行っていないイントロン部分の異常が原因となる症例の存在も想定される．

またこれまでも，種々の検出法によりFHの遺伝子診断が試みられてきたが，その結果としてLDL-R活性の低下がみられず，FDBでもない症例が相当数存在することが報告されている[75)76)]．そういった症例がどのような原因により高LDL-C血症を呈しているのかは，今のところ明らかにはされていないが，LDL-RあるいはapoB-100遺伝子以外の遺伝子変異が原因である可能性も示唆されており，今後の検討課題である．

結　　論

日本人遺伝性高LDL-C血症患者において，LDL-RおよびapoB-100遺伝子変異をPCR-DGGE法，直接塩基配列決定法およびPCR-RFLP法を用いて検討し，以下の結果を得た．

1．FHホモ接合体を発端者とした2家系において，PCR-DGGE法による検討からLDL-Rエクソン17の790番目のアミノ酸リジンをコードするコドンAAGが停止コドンであるTAGへと変化する変異K790Xを見いだした．これは以前のPCR-SSCP法での検討では検出されなかった変異であり，LDL-R遺伝子変異検出におけるPCR-DGGE法の有用性が示唆された．

2．FHホモ接合体を発端者とした1家系において，PCR-DGGE法による検討からLDL-Rエクソン5の245番目のアミノ酸アスパラギン酸をコードするコドンGATがアミノ酸アスパラギンをコードするコドンであるAATへと変化する変異D245Nを見いだし，FH Nahaと命名した．

3．北陸地方のFH201家系を対象とした頻度調査においてK790Xは20.9％と非常に高頻度に認められ，普遍的遺伝子変異と考えられた．K790XおよびFH Nahaを含め，合計11種のLDL-R遺伝子変異により，北陸地方のFH患者の38.8％が説明された．

4．臨床診断されたFHヘテロ接合体160家系200症例を対象として，apo B-100遺伝子コドン3456から3553をPCR-DGGE法により検討したが，同領域に遺伝子変異は認められなかった．日本人における遺伝性高LDL-C血症の原因としてFDBは極め

て低い頻度と考えられた.

謝 辞

稿を終えるに臨み，御指導，御校閲を賜りました恩師 馬渕 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内科学第二講座の梶波康二博士，八木邦公博士に心から謝意を表します．また，御助言，御協力を戴きました金沢大学医学部保健学科稲津明広助教授，金沢大学医学部附属病院総合診療部小泉順二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医学部内科学第二講座第一研究室の各位，ならびに高分子DNAの採取等に際し御協力を頂いた山本幸夫氏，水野美保子氏に感謝いたします．また，貴重な症例を御紹介頂いた群馬大学医学部第二内科伊藤弘麿先生，永井良三先生に感謝いたします．

本研究の一部は平成9年度日本動脈硬化学会冬季大会（平成9年11月27－28日，広島），XIII International Symposium on Drug Affecting Lipid Metabolism (May 30－June 3, 1998, Florence, Italy) において発表した．

文 献

1) 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

2) Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomized trial of cholesterol lowering in 4,444 patients with coronary heart disease. Lancet 344: 1383-1389, 1994

3) Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. *In* CR Scriver, AL Beaudet, 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) Kane JP, Havel RJ. Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. *In* CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle (eds), The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 7th ed, p1853-1885, McGraw-Hill Book Co, New York, 1995

5) 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

6) Mabuchi H, Koizumi J, Shimizu M, Takeda R. Development of coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. Circulation 79: 225-232, 1989

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, 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

10) Mabuchi H, Michishita I, Takeda M, Fujita H, Koizumi J, Takeda R, Takada S, Oonishi M. A new low density lipoprotein apheresis system using two dextran sulfate cellulose columns in an automated column regenerating unit (LDL continuous apheresis). Atherosclerosis 68: 19-25, 1987

11) 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

12) Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. Hum Mutat 1: 445-466, 1992

13) Varret M, Rabes JP, Thiart R, Kotze MJ, Baron H, Cenarro A, Descamps O, Ebhardt M, Hondelijn JC, Kostner GM, Miyake Y, Pocovi M, Schmidt H, Schuster H, Stuhrmann M, Yamamura T, Junien C, Beroud C, Boileau C. LDLR database (second edition): new additions to the database and the software, and results of the first molecular analysis. Nucleic Acids Res 26: 248-252, 1998

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

15) 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

16) 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

17) 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 II): 278, 1991

18) 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 Int Med 227: 247-251, 1990

19) 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

20) 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

21) 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

22) 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

23) 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

24) 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

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

26) Soria LF, Ludwig EH, Clarke RG, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. Proc Natl Acad Sci USA 86: 587-591, 1989

27) Tybjaerg-Hansen A, Humphries SE. Familial defective apolipoprotein B-100: a single mutation that causes hypercholesterolemia and premature coronary disease. Atherosclerosis 96: 91-107, 1992

28) 馬渕 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

29) Nohara A, Yagi K, Inazu A, Kajinami K, Koizumi J, Mabuchi H. Absence of familial defective apolipoprotein B-100 in Japanese patients with familial hypercholesterolaemia. Lancet 345: 1438, 1995

30) Pullinger CR, Hennessy LK, Chatterton JE, Liu W, Love JA, Mendel CM, Frost PH, Malloy MJ, Schumaker VN, Kane JP. Familial ligand-defective apolipoprotein B: identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. J Clin Invest 95: 1225-1234, 1995

31) Gaffney D, Reid JM, Cameron IM, Vass K, Caslake MJ, Shepherd J, Packard CJ. Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15: 1025-1029, 1995

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

33) Eiken HG, Knappskog, 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

34) 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

35) 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

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) Nissen H, Guldberg P, Hansen AB, Petersen NE, Horder M. Clinically applicable mutation screening in familial hypercholesterolemia. Hum Mutat 8: 168-177, 1996

38) Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleotide 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 α-globin and HLA-DQa DNA with allele-specific oligonucleotide probes. Nature 324: 163-166, 1986

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

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

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

43) 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

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

45) Fischer SG, Lerman LS. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. Proc Natl Acad Sci USA 80: 1579-1583, 1983

46) Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM. Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. Proc Natl Acad Sci USA 86: 232-236, 1989

47) Cooper DN, Krawczak M. Single base-pair substitutions in human gene mRNA splice junctions and their phenotypic consequences. *In* Cooper DN, Krawczak (eds), Human Gene Mutation, 1st ed, p239-260, BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, 1993

48) Yamakawa-Kobayashi K, Kobayashi T, Obara T, Hamaguchi H. Four new nucleotide sequence polymorphisms in the LDL receptor gene detected by SSCP analysis. Hum Genet 923: 76-78, 1993

49) Hobbs HH, Esser V, Russell DW. AvaII polymorphism in the human LDL receptor gene. Nucleic Acids Res 15: 379, 1987

50) Maruyama T, Miyake Y, Tajima S, Harada-Shiba M, Yamamura T, Tsushima M, Kishino B, Horiguchi Y, Funahashi T, Matsuzawa Y, Yamamoto A. Common mutations in the low-density-lipoprotein-receptor gene causing familial hypercholesterolemia in the Japanese population. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15: 1713-1718, 1995

51) 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

52) 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

53) 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

54) 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

55) Leiterdorf 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

56) 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

57) 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

58) 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

59) 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

60) Moorjani S, Roy M, Gagne C, Davignon J, Brun D, Toussaint M, Lambert M, Campeau L, Blaichman S, Lupien P. Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Quebec province. Arteriosclerosis 9: 211-216, 1989

61) Aalto-Setala K, Koivisto U-M, Miettinen TA, Gylling H, Kesaniemi YA, Pyorala 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

62) Koivisto U-M, Turtola H, Aalto-Setala K, Top B, Frants RR, Kovanen PT, Syvanen 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

63) Koivisto U-M, Palvimo 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

64) 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

65) 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

66) 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

67) Hamalainen T, Palotie A, Aalto-Setala K, Kontula K, Tikkanen MJ. Absence of familial defective apolipoprotein B-100 in Finnish patients with elevated serum cholesterol. Atherosclerosis 82: 177-183, 1990

68) Friedlander Y, Dann EJ, Leitersdorf E. Absence of familial defective apolipoprotein B-100 in Israeli patients with dominantly inherited hypercholesterolemia and in offspring with parental history of myocardial infarction. Hum Genet 91: 299-300, 1993

69) Schwartz EI, Shevtsov SP, Kuchinski AP, Kovalev YP, Plutalov OV, Berlin YA. Approach to identification of a point mutation in apo B100 gene by means of a PCR-mediated site-directed mutagenesis. Nucleic Acids Res 19: 3752, 1990

70) Myant NB, Forbes SA, Day INM, Gallagher J. Estimation of the age of the ancestral arginine3500→glutamine mutation in human apoB-100. Genomics 45: 78-87, 1997

71) Choong M, Koay ES, Khoo K, Khaw M, Sethi SK. Denaturing gradient-gel electrophoresis screening of familial defective apolipoprotein B-100 in a mixed Asian cohort: two cases of arginine3500→tryptophan mutation associated with a unique haplotype. Clin Chem 43: 916-923, 1997

72) Tai D, Pan J, Lee-Chen G. Identification and haplotype analysis of apolipoprotein B-100 Arg3500→Trp mutation in hyperlipidemic Chinese. Clin Chem 44: 1659-1665, 1998

73) Boren J, Lee I, Zhu W, Arnold K, Taylor S, Innerarity TL. Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. J Clin Invest 101: 1084-1093, 1998

74) Webb JC, Patel DD, Shoulders CC, Knight BL, Soutar AK. Genetic variation at a splicing branch point in intron 9 of the low density lipoprotein (LDL)-receptor gene: a rare mutation that disrupts mRNA splicing in a patients with familial hypercholesterolaemia and a common polymorphism. Hum Mol Genet 5: 1325-1331, 1996

75) Lestavel-Delattre S, Benhamamouch S, Agnani G, Luc G, Bard JM, Brousseau T, Billardon C, Kusnierz JP, De Gennes JL, Fruchart JC, Clavey V. Evidence of non-deficient low-density lipoprotein receptor patients in a pool of subjects with clinical familial hypercholesterolemia profile. Metabolism 43: 379-402, 1994

76) Sun X, Patel DD, Knight BL, Soutar AK, with the Familial Hypercholesterolaemia Regression Study Group. Comparison of

the genetic defect with LDL-receptor activity in cultured cells from patients with a clinical diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17: 3092-3101, 1997

Molecular Genetic Analysis of the Low Density Lipoprotein Receptor Gene and Apolipoprotein B-100 Gene using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

Atsushi Nohara, The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **107,** 357 — 371 (1998)

Key words familial hypercholesterolemia, familial defective apolipoprotein B-100, denaturing gradient gel electrophoresis, low density lipoprotein receptor, gene mutation

Abstract

Familial hypercholesterolemia (FH) and familial defective apolipoprotein B-100 (FDB) are caused by mutations in the genes encoding the low density lipoprotein receptor (LDL-R) and the apolipoprotein B-100 (apo B-100), respectively. These inherited disorders are characterized clinically by elevated concentrations of LDL, deposition of LDL-derived cholesterol in the arterial wall (atheromas) as well as in the tendons and skin (xanthomas), premature coronary heart disease, and autosomal dominant trait inheritance. Nine mutations at the LDL-R locus—four large deletions and five missense mutations—have been previously identified in Japan's Hokuriku district by Southern blotting and polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analyses. Although these nine mutations accounted for 17.5% of the FH patients in the Hokuriku district, the majority of the mutations are still not detectable by these two methods. FDB has been frequently identified among many Caucasian populations, but no patients with FDB have been reported in Japan. Recently, many reports have suggested that PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) analysis is more sensitive than the previously employed methods. Thus, we designed a mutation screening assay based on the DGGE technique for the promoter region and 18 exons of the LDL-R gene, and the region around the codon 3500 of the apo B-100 gene. Five homozygous FH patients were examined, and two previously unreported mutations were identified: a nonsense mutation in exon 17 (the K790X mutation) and a novel missense mutation in exon 5 (the D245N mutation). The D245N mutation was named FH Naha. The frequency of the K790X mutation was examined by PCR-restriction fragment length polymorphism, and this mutation was identified in 42 individuals in 201 unrelated heterozygous FH patients in Hokuriku district (20.9%). Including the nine previously identified mutations, eleven LDL-R gene mutations were found, identifying 38.8% of the FH patients in the Hokuriku district. In the case of the codon 3500 region of the apo B-100 gene, 200 unrelated heterozygous FH patients in the Hokuriku district were examined, and no individuals with apo B-100 mutation were detected. This suggests that FDB is very rarely the cause of genetic hyper-LDL-cholesterolemia in Japan.