

# Low-Density Lipoprotein Receptor Mutations in Homozygous Patients with Familial Hypercholesterolemia

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8514">http://hdl.handle.net/2297/8514</a>

## 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

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

八 木 邦 公

家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia, FH) は低比重リポ蛋白受容体 (low density lipoprotein receptor, LDL-R) 遺伝子の異常によって起こり, 高頻度に冠動脈硬化症を併発する. 特にホモ接合体性 FH 症例では, 平均26歳で虚血性心疾患により死亡するため早期診断および早期治療が重要である. ホモ接合体性 FH 症例19家系21例について LDL-R 遺伝子の検討を行った. 対象者の末梢白血球より分離した高分子 DNA を用いて, LDL-R 遺伝子の18エクソンのそれぞれに対応した19対のプライマーを設計しポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) を行い DNA 断片を増幅させ, PCR 一本鎖構成体多型 (PCR-single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP) 法にて異常構成体を検出し, 各異常構成体に対して直接塩基配列決定法 (direct sequencing) を行い遺伝子変異の確定を行った. その結果 LDL-R 遺伝子の第6エクソンの点変異 (D280Y: GAC (アスパラギン酸) から TAC (チロシン)) と第14エクソンの点変異 (P664L: CCG (プロリン) から CTG (ロイシン)) の2つを確定しそれぞれの変異を発端者の出身地より FH Tsuruga, FH Kanazawa-2 と命名した. さらに PCR 制限酵素切断多型 (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 法により家系内診断及びヘテロ接合体性例200例を対象としての遺伝子変異のスクリーニングを行った. FH Tsuruga では発端者が真性のホモ接合体性FH症例であり, その兄がヘテロ接合体性 FH 症例であることが確認された. 他の家系には同変異は見いだされなかった. FH Kanazawa-2 は FH Gujerat と同型の変異であるがハプロタイプ解析より新変異 (new mutation) と考えられた. 発端者はコンパウンド型ヘテロ接合体性 FH 症例 (compound heterozygote) であり, その兄も同変異を有し, 変異は父親由来であった. 頻度調査では血縁の無い6家系19名に同変異が確認され金沢北部に由来する遺伝子変異と考えられた. その臨床像は冠動脈疾患併発例が多く重症型 FH であると考えられた. FH Tonami-1, FH Tonami-2 の血清脂質値と比較して HDL-C 低値の傾向があり, それが臨床像の重症度に関与している可能性が示唆された. 他のホモ接合体性 FH 症例での変異部位の検討より我が国の LDL-R 遺伝子変異の多様性が確認された.

**Key words** homozygous familial hypercholesterolemia, polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism, direct sequencing, FH Tsuruga, FH Kanazawa-2

血清コレステロールの主な運搬体である低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) は肝臓, 副腎皮質等の細胞表面に存在する LDL 受容体 (LDL receptor, LDL-R) によって細胞内に取り込まれる. コレステロールは3ヒドロキシ3メチルグルタルリ補酵素 A (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 還元酵素を律速段階とする経路を介して細胞内合成もされるが, LDL-R が細胞内コレステロール調節において中心的役割を果たしている. LDL-R はアポ蛋白 B, E を含んだリポ蛋白粒子を取り込み, 血清 LDL およびその前駆体である中間比重リポ蛋白 (intermediate density lipoprotein, IDL), 超低比重リポ蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) の代謝速度を規定している<sup>1)</sup>.

ヒトの LDL-R は839アミノ酸よりなる糖蛋白で, 細胞膜を1回貫通するタイプの細胞膜レセプターである. LDL-R の構造

遺伝子は第19番染色体の短腕近位部 (p13.1-13.3) に存在し<sup>2)</sup>, 全長45キロ塩基対 (kilobase pair, Kbp) で17イントロン18エクソンからなり, 5.3Kbp の mRNA をコードする<sup>3,4)</sup>.

この LDL-R 遺伝子の変異<sup>5,6)</sup>により LDL-R に構造異常もしくは欠失が起る. LDL-R の合成, 機能のどの段階で障害が起るかによって合成障害 (receptor synthesis defective), 細胞内転送障害 (transport defective), アポ蛋白結合障害 (ligand binding defective), アポ蛋白細胞内取込み障害 (internalization defective), レセプターの再利用障害 (recycling defective) の5つの機能的クラスに分類される.

LDL-R の障害の結果 LDL, IDL, VLDL の血中からのクリアランスが低下し血中濃度が上昇する疾患が家族性高コレステロール血症である<sup>1)</sup>.

家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia,

平成5年11月19日受付, 平成5年12月27日受理

Abbreviations: Asp, aspartic acid; dATP, deoxy adenine triphosphate; dCTP, deoxy cytosine triphosphate; dGTP, deoxy guanine triphosphate; ddATP, dideoxy adenine triphosphate; ddCTP, dideoxy cytosine triphosphate; ddGTP, dideoxy guanine triphosphate; dTTP, deoxy thymine triphosphate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FH, familial hypercholesterolemia; HDL, high density lipoprotein; HDL-C,

FH) は幼少時よりの高コレステロール血症の持続の結果、アキレス腱をはじめとする腱黄色腫<sup>9)</sup>等特徴的臨床所見を呈し、早発性冠動脈硬化症を来し虚血性心疾患を高率に発症する<sup>9)</sup>常染色体性優性遺伝の疾患である。

LDL-R 遺伝子の対立遺伝子の両方に異常があるホモ接合体性 FH は100万人に一人、一方のみに異常があるヘテロ接合体性 FH は500人に一人以上の頻度で認められ、ホモ接合体性 FH は平均26歳で全例が心臓死を遂げる<sup>10)</sup>。したがって FH は LDL コレステロールと動脈硬化病変との関連<sup>11)</sup>の解明に重要なモデル疾患である。

従来本症の診断はその臨床像により行われることがほとんどであったが、特にホモ接合体性 FH を遺伝子診断により早期診断し早期治療することは虚血性心疾患の予防のためにも重要である。

本症に対する遺伝子レベルからの検討は1984年ヒトの LDL-R 遺伝子の cDNA がクローニングされて<sup>12)</sup>以来可能になった。LDL-R の遺伝子変異のスクリーニングおよび確定のためにサザンブロッティング法<sup>13)</sup>を中心とした技法がまず用いられてきた。それにより当科においても Kajinami らが4つの遺伝子変異 FH Tonami-1, FH Tonami-2, FH Kanazawa-1, FH

Okayama を見いだしているが<sup>14)~18)</sup>、FH 症例全体の約10%を説明しうるに過ぎず、残りの大部分は数塩基対以内の小変異と推定されていた。

今回サザンブロッティング法では見いだし得なかった小変異を検出するために PCR 一本鎖構成体多型 (PCR-single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP) 法<sup>19)~23)</sup>および直接塩基配列決定法 (direct sequencing)<sup>24)25)</sup>を、さらに変異のスクリーニングと確認のために PCR 制限酵素切断多型 (PCR restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 法<sup>26)~28)</sup>を導入した。その結果、2つの新たな遺伝子変異を確定し LDL-R 変異と臨床像の関連を検討した。

#### 対象および方法

##### I. 対 象

馬淵らの診断基準<sup>29)</sup>、すなわち1) 血清総コレステロール 230mg/dl 以上で腱黄色腫を認めること、2) 一親等内に本症があり血清総コレステロール 230mg/dl 以上であること、のいづれかを満足するとし、北陸地方を中心に集められた FH 症例のうち、血清総コレステロール濃度、アキレス腱肥厚の程度、家系調査上ホモ接合体性 FH と考えられた19家系21症例 (表

Table 1. Clinical data of the patients with homozygous familial hypercholesterolemia (FH)

Patient number	Age (year)	Sex <sup>a)</sup>	Laboratory data <sup>b)</sup>				
			T-Chol (mg/dl)	TG mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	ATT (mm)	IHD
1	33	M	560	254	28	9	+
	23	M	589	96	28	6	-
2	52	F	626	334		31	-
	54	M	558	388	26	31	+
3	28	F	535	98			-
4	37	F	613	59	36	26	-
5	45	M	536	49		42	+
6	38	F	460	79	15		+
7	25	M	760	97	34		+
8	52	M	540	104			
9	20	M	567				
10	39	M	550			27	+
11	30	F	427	99	27	23	+
12	40	F	550	143		8	+
13	34	M	500	115	40	17	-
14	69	F	697			20	-
15		M					
16		F					
17	25	F	530				
18	38	F	590			14	+
19	36	M	500	291	26		+

<sup>a)</sup> M, male; F, female.

<sup>b)</sup> T-Chol, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; ATT, Achilles tendon thickness on X-ray film; IHD, ischemic heart disease; -, load negative; +, load positive.

All values are pre-treatment for FH.

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

1) とヘテロ接合体性 FH で異なる家系由来の200症例をスクリーニングの対象とした。

II. 方法

1. 高分子 DNA の抽出

対象者の末梢静脈血 10ml をエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (ethylenediaminetetraacetic acid 2Na, EDTA-2Na) を抗凝固剤として採取し 4℃にて移送し -20℃にて保存した。この末梢血を室温にて解凍後トライトン X-100 融解変法<sup>30</sup>にて高分子 DNA を単離した。すなわち 320mM ショ糖液, 1%トライ

トン X-100, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl, pH7.6 を含む融解液にて赤血球を溶血させ、遠心により沈殿として白血球を集めた。これをプロテアーゼ (Sigma, St. Louis, USA) にて消化後、フェノール=クロロホルム (1:1) で1回、続いてクロロホルム=イソアミルアルコール (24:1) にて2回抽出し、最後にエタノール沈殿を行った。こうして得られた DNA を 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA-2Na, pH8.0 に溶解のうえ 260nm における吸光度測定により濃度を求めた。

2. ポリメラーゼ連鎖反応法 (polymerase chain reaction,

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

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

Oligonucleotides complementary to DNA sequences flanking exons of the human LDL receptor gene were synthesized on ABI 380A DNA synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, USA) and used to amplify the intervening sequences with the polymerase chain reaction (PCR).

chain reaction-restriction fragment length polymorphism; PNK, polynucleotide-kinase; Pro, proline; RI, radioisotope; TBE, Tris-boric acid-EDTA; T-Chol, total cholesterol; TG, triglyceride; Tyr, tyrosine; TTP, thymine triphosphate; VLDL, very low density lipoprotein

## PCR)

Hobbs らの報告<sup>21)</sup>を参考にしながら、ジーンバンクのデータベースに登録されているヒト LDL-R 遺伝子配列をもとに18エクソンすべてを含むように設計した25塩基長前後のプライマー計19組を作成した(表2)。エクソン4は400bp以上となりPCR-SSCPに用いるには大き過ぎるため2つに分割した。

プライマーはDNA合成機モデル381A(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<sup>22)</sup>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10pmol/μlになるように濃度を調整した。

DNA断片の増幅にはSaikiら<sup>23)</sup>によるPCR法を用いた。高分子DNA1μgを鋳型DNAとして40pmolのプライマー1セットと200μMの各デオキシヌクレオチド[デオキシアデニン三リン酸(deoxy adenine triphosphated, ATP), デオキシシトシン三リン酸(deoxy cytosine triphosphate, dCTP), デオキシグアニン三リン酸(deoxy guanine triphosphate, dGTP), チミン三リン酸(thymine triphosphate, TTP)]と2.5単位のTaqポリメラーゼ(Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, USA)を10mM Tris-HCl, pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01%ゼラチンを含む緩衝液に加え再滅菌蒸留水を加え計25μlとなるようにして攪拌した。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℃1分、68℃3分を基本にそれぞれのセット毎に決定した温度条件のもと30サイクルの反応を行った。エクソン6のPCR-SSCP用の反応ではSp64(5'-TCC TTC CTC TCT CTG GCT CTC ACA G-3'), Sp65(5'-GCA AGC CGC CTG CAC CGA GAC TCA C-3')のプライマーを用いて伸長反応温度68℃で反応を行い、直接塩基配列決定法では同じプライマーだが伸長反応温度72℃で反応を行った。エクソン14のPCR-SSCP用の反応ではOligol(5'-CCT GAC TCC GCT TCT TCT GCC-3'), Oligo2(5'-CCA CAC CTG TGA GGC AGC TCC-3')のプライマーを用いて伸長反応温度72℃で反応を行い、直接塩基配列決定法では同じプライマーだが伸長反応温度74℃で反応を行った。

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Phy X174/HaeIIIダイジェスト(東洋紡, 東京)と共に泳動して断片長を確認し、濃度の検討をつけた上でクロロホルムで抽出した。

## 3. PCR-SSCP 法

泳動用緩衝液としてTris-HCl 54g, ホウ酸 27.5g, 0.5M EDTA 20mlに蒸留水を加え3000mlにしたものを保存用のx5 Tris-ホウ酸-EDTA(Tris-boric acid-EDTA, TBE)泳動用緩衝液とし泳動直前に適当な濃度に希釈した。

0.5mM EDTA 2μl, 5N NaOH 10μl, 滅菌再蒸留水 88μlを混合しアルカリ溶液を作り、PCR産物6μlにアルカリ溶液2μlを加え42℃3分、95℃5分加熱後-20℃に急冷し一本鎖に変性させた。その上でグリセロールを加えた6-8%のポリアクリルアミドゲル(アクリルアミド/ビス(48:1)(Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA)に泳動した。泳動時の温度、ゲルの濃度、泳動用緩衝液の濃度、グリセロールの有無等の条件はエク

ソン毎に決定した。エクソン6およびエクソン14の泳動の場合には40cm長のガラスプレートを用いて6%ポリアクリルアミドゲルに15%のグリセロールを加えゲル板を作成し、x0.6TBE泳動用緩衝液を用いて4℃のもと800Vで10時間泳動した。

染色にはBIO-RAD銀染色キット(Bio-Rad)を用いプロトコールに従って銀染色を行った。10%メチルアルコール100mlにて30-60分間ゲルの固定を行いx1酸化剤100mlにて5分間酸化させた。蒸留水で15分間に6-7回水を変えながらすぎ余分な酸化剤を除き、x1銀染色溶液を加え20分以上振とうさせた。その後30秒以内に洗浄しx1現像液を加えバンドの出現を確認した。ある程度以上バンドが濃くなったら5%酢酸100mlを5分間加え反応を停止させ、蒸留水で洗浄し30%メチルアルコール100mlに3日間以上浸してゲルを収縮させ、グリセロールを両面に均等に塗布して水に浸したセルロースフィルム二枚の間にはさみ正方形の枠に固定して乾燥させた。

## 4. 直接塩基配列決定法(direct sequencing)

1) ラジオアイソトープ(radioisotope, RI)直接塩基配列決定法

PCR-SSCP法に用いるより伸長反応温度を2-4℃上げて反応を行った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。

10pmol/μlのプライマー3μlをT4ポリヌクレオチドキナーゼ(polynucleotide-kinase, PNK, 東洋紡)1μl, x10 PNK反応緩衝液1μl, <sup>32</sup>P-γ ATP(>185TBq/mmol, 37MBq/ml)(Amersham, Buckinghamshire, UK)5μlを混合し37℃60分反応させ95℃5分でPNKを失活させ5'末端をRI標識した。

ジデオキシ法<sup>24)</sup>の改良版であるHiguchiのプロトコール<sup>25)</sup>に従ってT7 DNAポリメラーゼ(シーケネース, Sequenase Ver2.0, United States Biochemical Corporation(USB), Cleaveland, USA)で、もしくはTthポリメラーゼ(オートサイクルシーケンスキット, Autocycle Sequencing Kit, Pharmacia-LKB)を用い反応を行った。

T7 DNAポリメラーゼでの反応を示す。Higuchiのプロトコール<sup>25)</sup>では鋳型DNA9μlを5'末端RI標識プライマー3μlに加え95℃5分で変性させ、その後-20℃に急冷することで鋳型DNAをプライマーと結合させ鋳型/プライマー混合液とした。1反応当たりx5反応緩衝液0.376μl, 0.1M DTT0.22μl, シーケネース0.15μlを混合し前混合液とした上でジデオキシアデニン三リン酸(dideoxy adenine triphosphate, ddATP)/dATP, ジデオキシシトシン三リン酸(dideoxy cytosine triphosphate, ddCTP)/dCTP, ジデオキシグアニン三リン酸(dideoxy guanine triphosphate, ddGTP)/dGTP, デオキシチミン三リン酸(deoxy thymine triphosphate, dTTP)/TTPの各反応終始混合液2.5μlに前混合液0.75μlを加えた各A-T混合物3μlに鋳型/プライマー混合液2.5μlを加え37℃15分反応させ反応停止液を加え-20℃に保存し、泳動直前に95℃5分に続き-20℃に急冷し泳動した。

Tthポリメラーゼでの反応を示す。鋳型DNA0.2-4μg, 蛍光もしくはRI標識した1pmol/μlプライマー2μl, 反応用緩衝液2μl, デオキシヌクレオチド三リン酸(deoxy nucleotide triphosphate, dNTP)溶液5μl, 反応直前に希釈用緩衝液で

1.25units/ $\mu$ l とした Tth ポリメラーゼ 2 $\mu$ l に再滅菌蒸留水を総量 18 $\mu$ l となるように追加し攪拌の上遠心したものを 4 $\mu$ l ずつとり、反作用マイクロチューブにとり冷却しておいた各 ddATP, ddCTP, ddGTP, dTTP 溶液 2 $\mu$ l ずつに加え 50 $\mu$ l のミネラルオイルを上にとらし、95 $^{\circ}$ C 36秒、72 $^{\circ}$ C 1分24秒で25回反応させ終了後に反応停止液 4 $\mu$ l を加え-20 $^{\circ}$ C に保存し、泳動直前に95 $^{\circ}$ C 5分に続き-20 $^{\circ}$ C に急冷し泳動した。

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

エクソン6ではシーケンスで Higuchi のプロトコール<sup>25)</sup>を用いて反応を行った。泳動は40cm長の8%ポリアクリルアミドゲルを用い、室温のもと x0.6 TBE 泳動用緩衝液で1200V、8時間かけて泳動した。ゲルを乾燥して X 線フィルムに72時間露光しオートラジオグラムを得た。またエクソン14は二次構造が強くシーケンスでは明瞭な結果が得られなかったためオートサイクルシーケンスキットで Tth ポリメラーゼの反応を行った。泳動は60cm長の8%ポリアクリルアミドゲルを用い、4 $^{\circ}$ C で x1 TBE 泳動用緩衝液で1500V、12時間かけて泳動した。ゲルを乾燥して X 線フィルムに72時間露光しオートラジオグラムを得た。

2) 自動化直接塩基配列決定法

自動化直接塩基配列決定法<sup>35)36)</sup>としてオートリードシーケンサー(A.L.F., Auto Read Sequencer, Pharmacia-LKB)を用いた。鋳型 DNA の処理は RI 法に同じ。プライマーをプライマー蛍光標識キット(Fluore Prime, Pharmacia-LKB)にて合成段階で5'末端蛍光標識した。直接塩基配列決定反応自体は先に記載した RI 直接塩基配列決定法と同様でシーケンスもしくはオートサイクルシーケンスキットを用いて反応を行った。

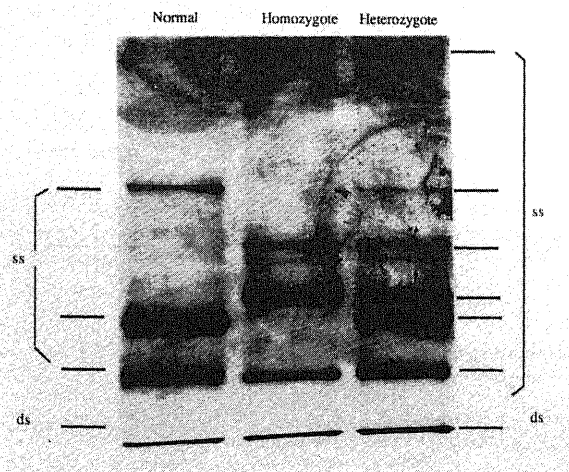


Fig.1. Polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analysis in the exon 6 of low density lipoprotein (LDL)-receptor gene. The bars along the left side indicate the wild pattern. The bars along the right side indicate the co-existence of the wild pattern and mutational pattern in the heterozygous patient. ss, single strand band; ds, double strand band.

6%ポリアクリルアミドゲルはアクリルアミド/ビス(19:1)を用い、泳動用緩衝液は x0.6 TBE 泳動用緩衝液を用い、室温のもと 1300V 6時間かけて反応を行った。泳動は1.25秒毎にオートリードシーケンサーがレーザービームによってスキャンしパーソナルコンピュータ PS/2 モデル 70 (IBM, Armonk, USA) 本体内蔵の固定ディスク内に数値データとして蓄積された。反応終了後に塩基配列解析を自動的にを行い配列の文字データとして出力し、同時にスキャンした数値データを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、特定の制限酵素で切断部位が生じるようにプライマー設計した。エクソン6では変異配列でのみ制限酵素 Mbo-I (東洋紡)による切断部位が出現するように設計した3'末端用変異プライマー Mbo-m (TGA TGG GTT CAT CTC ACC AGT CCC GGC AGG) と正常配列でのみ制限酵素 Hinf-I (New England Biolab, Beverly, USA) による切断部位が出現するように設計した3'末端用変異プライマー Hinf-n (TGA TGG GTT CAT CTG ACC AGT CCC GGG AGT) を設計した。

変異のスクリーニングのため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。その上でクロロホルムは用いず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60分反応させさらに制限酵素を追加して60分反応させた。これは制限酵素の切断反応が部分反応になり切断部位を有しながら切断されない PCR 産物が残存し後の評価に影響を与えることを避けるためであった。そして3%低融点アガロース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存在を、変異が存在すればホモ接合体性症例かヘテロ接合体性症例かを評価した。

エクソン6ではまず変異配列の有無をスクリーニングするため、5'末端に Sp64 を用い3'末端側に Mbo-m を用いて95 $^{\circ}$ C 1分、68 $^{\circ}$ C 3分30サイクルの温度条件での PCR 法により DNA 断片を増幅した。その上でミネラルオイルの下層より PCR 産

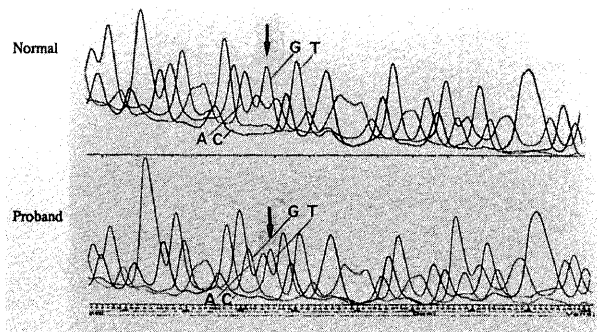


Fig.2. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 6 of LDL-receptor gene. Each curve indicates adenine (A), cytosine (C), guanine (G) and thymine (T). The graph below is the result of homozygous patient with FH Tsuruga. The arrow indicates G peak of the mutant. The graph above is the result of normal subject. The arrow indicates T Peak of the wild type only.

物を 12 $\mu$ l 取り出し, x10 制限酵素 Mbo-I 用反応緩衝液 1.5 $\mu$ l と制限酵素 Mbo-I 1.5 $\mu$ l を加え 37 $^{\circ}$ C 60 分反応させ, さらに制限酵素 Mbo-I 1.5 $\mu$ l を加え部分消化に終わらないように切断反応させた. そして 3% 低融点アガロースゲルに 5 $\mu$ l の反応産物, 制限酵素を作用させていない PCR 産物, サイズマーカー Phy X174/Hae III ダイジェストを同時に泳動した. 制限酵素を作用させていない PCR 産物と同じ大きさのバンドしか観察されなければ切断はなく対立遺伝子のいずれにも同変異は存在せず, 切断されたバンドのみならばホモ接合体性症例, 両方が認められればヘテロ接合体性症例と判断した. 変異が確認された場合特にヘテロ接合体性症例と考えられれば正常配列の有無を確認するため 5'末端側に Sp64 を用い 3'末端側に Hinf-n を用いて 95 $^{\circ}$ C 1 分, 68 $^{\circ}$ C 3 分 30 サイクルの温度条件での PCR 法により DNA 断片を増幅した. 今度は制限酵素 Hinf-I を作用させた上でサイズマーカー Phy X174/Hae III ダイジェストと共に泳動した. Mbo-m の反応で変異の存在が確認されているとして Hinf-I でも切断断片があればヘテロ接合体性症例, 無ければホモ接合体性症例と判断した.

一方エクソン14では変異配列のスクリーニングには変異プライマーは用いず 5'末端側に Oligo1 を用い 3'末端側に Oligo2 を用いた通常の PCR 産物に制限酵素 Pst-I を作用させて上記と同様に切断の有無を観察して変異の有無を判定した. ヘテロ接合体性症例かホモ接合体性症例かの確認は適当な制限酵素を決定できず希釈した PCR 産物に制限酵素を 4 回追加して作用させ, 1/2 の濃度に希釈した PCR 産物も並行して泳動しそのバンドの濃さを比較することと, PCR-SSCP のバンドの出現パターンにて判断した.

#### 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, リポ蛋白の超速心分析は Havel ら<sup>39)</sup>の方法に従い超速心機 L8-55 およびローター 50.3Ti (Beckman, California, USA) を用いて行った. 血清総コレステロール (total cholesterol, T-Chol), 中性脂肪 (triglyceride, TG) は酵素法で測定した<sup>38)39)</sup>. アポ蛋白 (A-I, A-II, B, C-II, C-III, E) は免疫比濁法 (immunoturbidimetry, TIA) で測定した<sup>40)</sup>. 高比重リポ蛋白コレステロール (high

density lipoprotein cholesterol, HDL-C) は沈殿法で測定した<sup>41)</sup>. 低比重リポ蛋白コレステロール (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) は Friedewald の式<sup>42)</sup>で算出した. 血清脂質値の有意差検定は t-検定で行い P<0.05 を有意とした.

## 成 績

### 1. FH Tsuruga

#### 1. PCR-SSCP 法による異常構成体の検出

LDL-R のアポ B 結合領域であるエクソン 6 の PCR-SSCP 法によるスクリーニングにおいて一例に異常構成体が検出された. 図 1 は正常者および, 発端者 S.Y. とその兄 K.Y. である. 発端者には正常者と異なった 3 本の SS のバンドが, その兄には正常者と発端者の両方のバンドが見いだされた. PCR 産物の大きさには正常者, 発端者とその兄に差はなく, 異常バンドの出現パターンと併せて発端者はエクソン 6 内の小変異のホモ接合体性症例でその兄は同変異のヘテロ接合体性症例の可能性が高いと考えられたため次の検索を進めた.

#### 2. 直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列の決定

まずオートリードシーケンサーを用いて自動化直接塩基配列決定法を行った. 図 2 上段の正常者では G のピークのみ存在している所に図 2 下段の発端者では T のピークのみが観察された. RI 直接塩基配列決定法にても図 3 に示すように正常者では G のバンドのみ存在している所に発端者では T のバンドのみが観察された. 周囲の配列を比較した結果同一部位であり G から T への塩基置換があり発端者は同変異のホモ接合体性症例と考えられた.

アミノ酸変異の有無を検討した結果, LDL-R の 280 番目のアミノ酸アスパラギン酸 (aspartic acid, Asp) に対応する配列 GAC がこの G $\rightarrow$ T 変異によるアミノ酸チロシン (tyrosine, Tyr) に対応する配列 TAC となっている (図 4) と確認された. 本変異はこれまでに報告がなく, 発端者の出身地より本変異を FH Tsuruga と命名した.

#### 3. 発端者について

発端者 S.Y. は福井県敦賀市出身の 44 才男性であり図 5 にその家系図を示した. 両親はいとこ婚, 家系内の他のホモ接合体

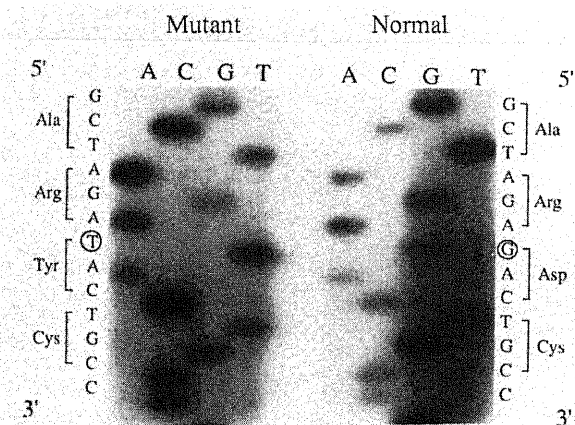


Fig. 3. Sequencing analysis of FH Tsuruga. The circle indicates the position of G to T mutation in the homozygous proband (left). Control (right) shows the G residue, indicating a wild type. Ala, alanine; Arg, arginine; Tyr, tyrosine; Cys, cysteine...

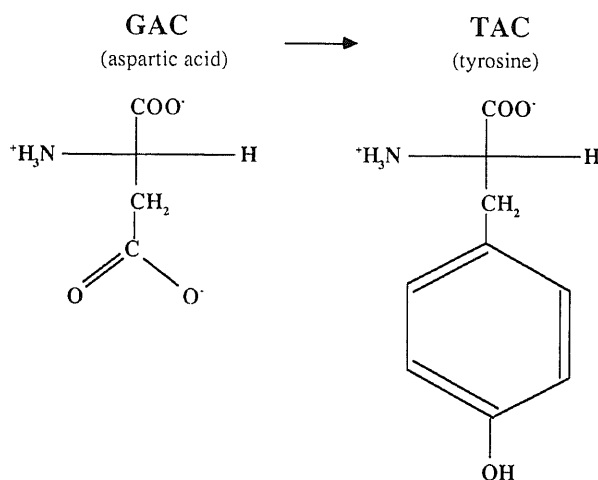


Fig. 4. Change of amino acid sequence of FH Tsuruga; G to T mutation in the exon 6 of human LDL-receptor gene.

性 FH 症例の姉、従姉はすでに心臓死していた。発端者の臨床像は T-Chol 655mg/dl, TG 95mg/dl, LDL-C 602mg/dl, HDL-C 34mg/dl, 高度の冠動脈病変を有し重症 FH と考えられた(表 3)。ホモ接合体性 FH で44才という年齢は高いが、これは24才で見いだされ以後積極的に治療されてきたため、現在も週二回の LDL アフェレーシスにて治療されている。兄 K.Y. も T-Chol 396mg/dl, LDL-C 337mg/dl と高値、PCR-RFLP 法にて同変異のヘテロ接合体性 FH と確認された(表 3)。

4. 北陸における頻度の調査

ヘテロ接合体性 FH200 症例に対し PCR-RFLP 法にて遺伝子変異の頻度調査を行ったが同変異は他の家系には検出されなかった。

II. FH Kanazawa-2

1. PCR-SSCP 法による異常構成体の検出

LDL-R の EGF 前駆体相同領域であるエクソン14の PCR-SSCP 法によるスクリーニングにおいて一例に異常構成体が検出された。図 6 は正常者および、発端者 A.T. とその父 Y.T., 母 Y.T., 兄 M.T. である。発端者とその父、兄に正常者

と異なる 1 本のバンドが認められた。異常バンドの出現パターンより発端者は同変異のヘテロ接合体性症例である可能性が高いと見られた。しかし臨床像はホモ接合体性症例であり、コンパウンド型ヘテロ接合体性症例の可能性が高いと考えられ次の検索を進めた。

2. 直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列の決定

RI 直接塩基配列決定法にて図 7 に示すように正常者では C のバンドのみ存在している所に発端者では C と T のバンドが観察された。本例はエクソン14の C から T への塩基置換であり発端者は同変異のヘテロ接合体性症例と考えられた。

アミノ酸変異の有無を検討した結果、LDL-R の664番目のアミノ酸プロリン (proline, Pro) に対応する配列 CCG が二番目の C の C→T 変異によりロイシン (leucine, Leu) に対応する配列 CTG となっていると確認された(図 8)。本例は遺伝子上ヘテロ接合体性であり、臨床像と併せてコンパウンド型ヘテロ接合体性症例と考えられた。発端者の家系図を図 9 に示す。また家族のバンドの出現パターンより同変異は父親由来であると考えられた。

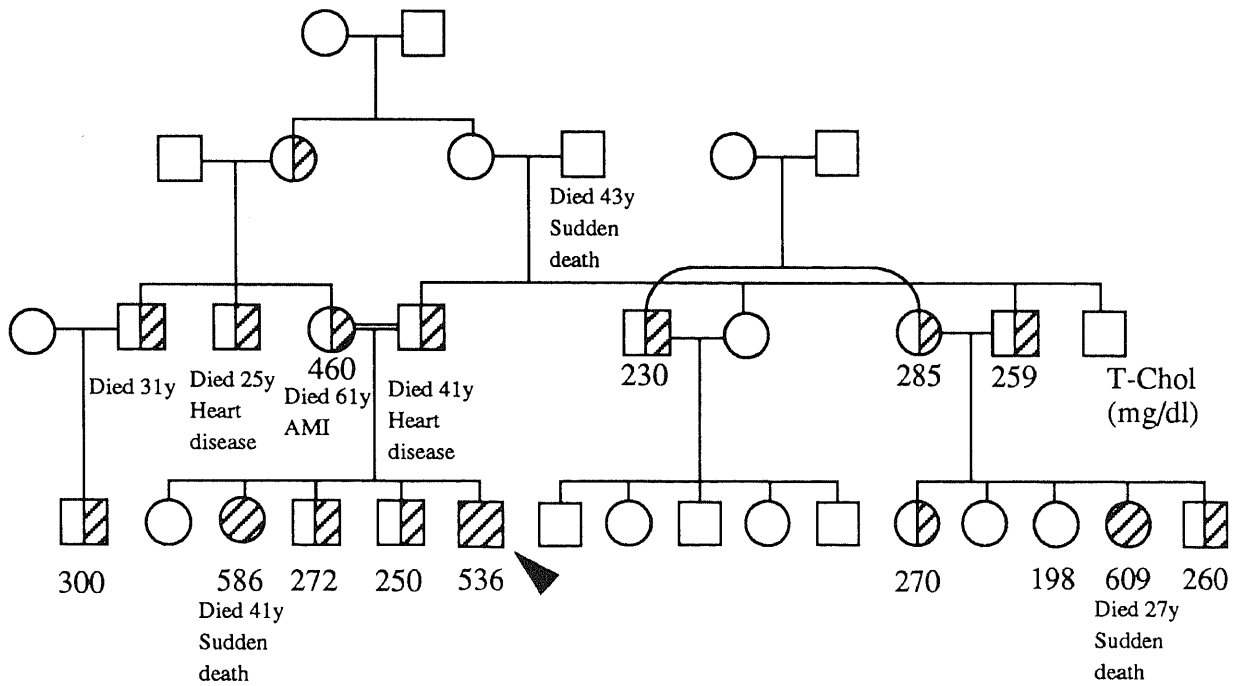


Fig. 5. The pedigree of S.Y. family. A first cousin marriage is observed between the parents of S.Y. The deceased family member was indicated with deceased age. The arrow indicates the proband. T-Chol, total cholesterol; ○, non-FH members; ◐, heterozygous patients with FH Tsuruga; ◑, homozygous patients with FH Tsuruga; y, year.

Table 3. Clinical data of the patients with homozygous or heterozygous FH Tsuruga

Patient	Age (year)	Sex <sup>a)</sup>	Laboratory data <sup>b)</sup>			
			T-Chol (mg/dl)	TG (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)
S. Y. with homozygote	44	M	655	95	572	34
K. Y. with heterozygote	54	M	396	121	337	35

<sup>a)</sup> M, male.

<sup>b)</sup> T-Chol, total cholesterol; TG, triglyceride; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol (calculated by Friedewald formula); HDL-C, high density lipoprotein cholesterol. All values are pre-treatment for FH.



LDL-R の664番目のアミノ酸に対応する配列が C→T 変異により Pro から Leu に変化する変異 P664L は1989年に Souter らによりインド亜大陸西部 Gujerat 出身のホモ接合体

性 FH 症例 M.M. に見いだされており<sup>43,44</sup> ロンドン周辺でも4家系が確認されている<sup>45</sup>。しかし、ハプロタイプ解析の結果(表4)より祖先は共通ではなく、同じ遺伝子変異が別に日本の症例に起こったもので本変異を新変異 (new mutation) と判断し、発端者および他の症例の分布より本変異を FH Kanazawa-2 と命名した。

3. 発端者について

本症例は金沢市出身の31才男性、両親にいとこ婚は無し。PCR-SSCP 法および PCR-RFLP 法にて兄や臨床ヘテロ接合

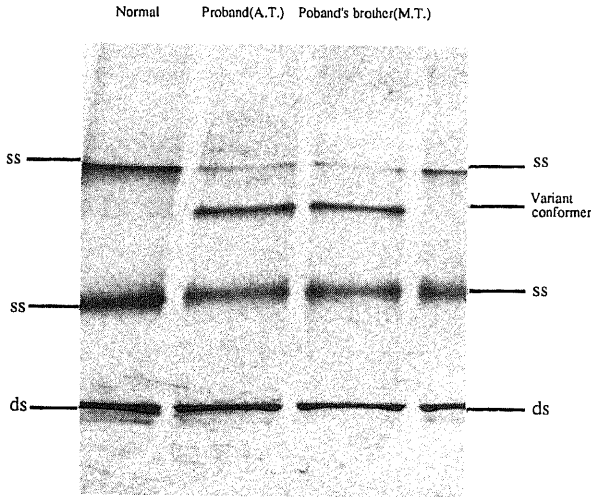


Fig. 6. PCR-SSCP analysis in the exon 14 of LDL-receptor gene. ss, wild band; variant conformer, mutant band; ds, double strand band.

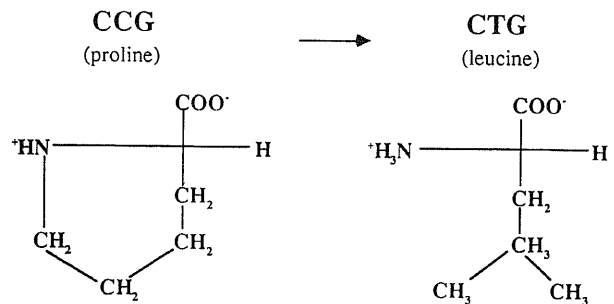


Fig. 8. Change of amino acid sequence of FH Kanazawa-2; C to T mutation in the exon 14 of human LDL-receptor gene.

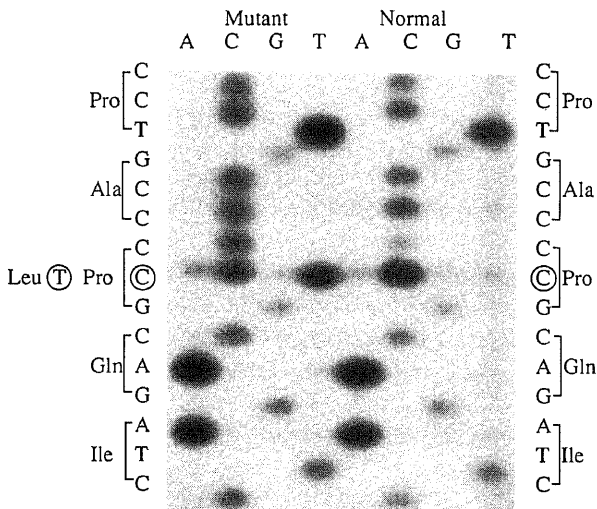


Fig. 7. Sequencing analysis of FH Kanazawa-2. The circle indicates the position of C to T mutation in the compound heterozygous proband (left). Control (right) shows the C residue, indicating a wild type. Pro, proline; Ala, alanine; Leu, leucine; Gln, glycine; Ile, isoleucine.

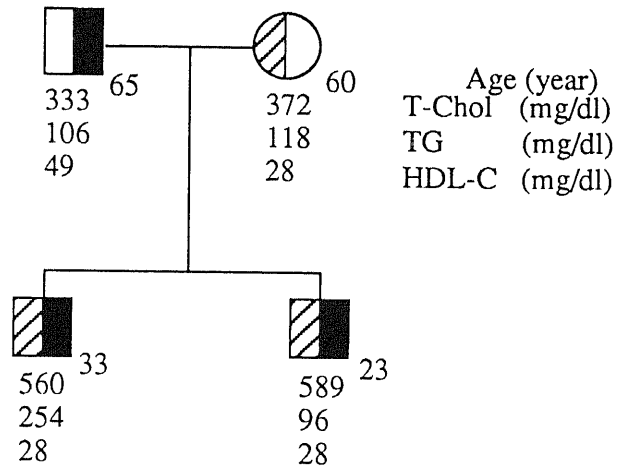


Fig. 9. The pedigree of A. T. family. The FH Kanazawa-2 mutation of the proband and his brother derived from their father. T-Chol, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol;  $\square$ , heterozygous patient with FH Kanazawa-2;  $\odot$ , heterozygous patient with unknown mutant;  $\blacksquare$ , compound heterozygous patient with FH Kanazawa-2 and unknown mutant.

Table 4. Haplotypes of patients with LDL-R P664L mutation

Name of patient	Ethnic background	RFLPs				
		Taq I	Ava II	Apa I	Pvu II	Nco I
A. T. (Kanazawa-2)	Japanese	+	+	-	-	+
M. M. (Gujerat proband)	Gujerat	-	+	+	-	+
4M	Gujerat	-	+	+	-	+
3K	Norway	-	+	+	-	+
1S	English	-	-	-	-	-
2Y	English	-	-	-	-	-

RFLP sites were listed from 5' to 3'.

体性例と考えられる父も同変異を有することが確認され、同変異が父方由来であると考えられた。発端者の臨床像は T-Chol 589mg/dl, TG 96mg/dl で冠動脈拡張症の所見を呈し重症 FH と考えられた<sup>46)</sup> (表 5)。兄弟とも現在月に 1-2 回の LDL アフェレーシスにて治療されている。

4. 北陸における頻度の調査

ヘテロ接合体性 FH200 家系に対し PCR-RFLP 法にて FH Kanazawa-2 変異のスクリーニングを行ったところ表 6 に示すように 6 家系 19 名の症例が見いだされた。その居住地、出身地は金沢市北部を中心とした地域であった。同変異にて北陸における FH の約 3% を説明し得ると考えられた。また重症の冠動脈疾患を有する例が多く FH Kanazawa-2 は重症型 FH である可能性が高いと考えられた。

5. 同変異での血清脂質値の検討

ヘテロ接合体性 FH の血清脂質値を FH Kanazawa-2, FH Tonami-1, FH Tonami-2 の 3 群で比較した (表 7)。T-Chol では 3 群に有意差はなかったが、LDL-C は FH Tonami-1 が FH Tonami-2 より有意 (P<0.01) に高値であり、TG は FH Tonami-2 が FH Tonami-1 より有意 (P<0.01) に高値であり、HDL-C は FH Kanazawa-2 が FH Tonami-1 より有意 (P<0.014) に低値であった。

考 察

LDL-R の遺伝子変異数は 1990 年の Hobbs の総説では 42 種類の変異が挙げられていた<sup>47)</sup> のが 1992 年末には 150 種類となっている<sup>48)</sup>。これは FH の遺伝子変異の検索に従来のサザンブロッティング法に加え新たな技法が導入されたためである。Goldstein & Brown の有するダラスコレクション (Dallas

Table 5. Clinical data of the patients with compound heterozygous or heterozygous FH Kanazawa-2

Patient	Laboratory data <sup>b)</sup>					
	Age (year)	Sex <sup>a)</sup>	T-Chol (mg/dl)	TG (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)
A. T. with compound heterozygote	23	M	589	96	542	28
M. T. with compound heterozygote	33	M	560	254	481	28
Y. T. with true heterozygote	65	M	333	106	261	49

<sup>a)</sup> M, male.

<sup>b)</sup> T-Chol, total cholesterol; TG, triglyceride; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol (calculated by Friedewald formula); HDL-C, high density lipoprotein cholesterol. All values are pre-treatment for FH.

Table 6. Clinical data of the heterozygous patients with FH Kanazawa-2

Patient number	Relation	Age (year)	Sex <sup>a)</sup>	Laboratory data <sup>b)</sup>				
				T-Chol (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	ATT (mm)	IHD
1-1	1-1	23	M	589	96	28	9	-
1-2	1-1's brother	33	M	560	254	28	9	+
1-3	1-1's father	65	M	324	100	47	7	-
2-1	2-1	60	M	259	158	30	9	-
2-2	2-1's sister	71	F	382	138	22	15.5	+
2-3	2-1's sister	43	F	292	106	49	12	+
2-4	2-1's cousin	66	F	263	96	36	9	-
2-5	2-1's relative	45	F	304	71	57	14	-
3-1	3-1	59	M	383	96	45	24	+
4-1	4-1	29	F	440	196		11.5	-
4-2	4-1's father	65	M	364	97			+
4-3	4-1's son	5	M	337	202	32		-
4-4	4-1's sister	25	F	392	78	58		-
5-1	5-1	48	M	334	82	29	12	+
5-2	5-1's son	21	M	312	39	45	7	-
6-1	6-1	43	M	322	251	22		+
6-2	6-1's brother	34	M	345	228	21		+
6-3	6-1's mother	66	F	363	141	24		-
6-4	6-1's sister	39	F	298	93	31		-
6-5	6-1's niece	13	F	318				-

<sup>a)</sup> M, male; F, female.

<sup>b)</sup> T-Chol, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; ATT, Achilles tendon thickness on X-ray film; IHD, ischemic heart disease; -, load negative; +, load positive; ++, 2-3 vessel disease; All values are pre-treatment for FH.

Collection)<sup>40</sup>とよばれるホモ接合体性 FH134 家系ヘテロ接合体性 FH13 家系計190変異のうち24変異が1989年までにサザンブロット法にて確定された。当科においても Kajinami らがサザンブロット法にて 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ト法で確定された変異は全変異の10%のみであり、サザンブロット法では見いだせない数塩基対以内の小変異が FH 全体の約90%を占めると考えられる。

小変異の検索の基本は塩基配列決定法だが Sanger らによるジデオキシ法<sup>41</sup>が主流である。対象遺伝子が小さければ全塩基配列を決定しながら変異を検索しても大きな労力は要しない。しかし LDL-R のように巨大な遺伝子で症例も多い場合一例一例をゲノム (genomic DNA) レベルで全塩基配列決定しながら変異を検索していくのは不可能に近い。ゲノムではなく cDNA を対象とすれば多少手間は省けるがゲノムがヒトの末梢静脈血から手軽に採取できるのに対し、cDNA の場合 mRNA の抽出が必要とされ、症例の多い FH の変異の検索手段としては難があった。

1989年の PCR-SSCP 法の出現は FH のみならず巨大な遺伝子を対象とした遺伝子変異の検索において画期的であった。ダラスコレクションのうち1990年までの約17年間に9例の小変異が確定されたのがこの3年間で79例確定されたことはそれを如実に物語っている。それまでに確定された小変異がある制限酵素の切断部位を生じさせるなどの偶然で確定されていたのが、PCR-SSCP 法ではほぼ普遍的に応用でき、その検出感度も高く再現性も高いため普及した。

PCR-SSCP 法は日本の国立癌研究所の腫瘍グループが1989年に発表した方法である。PCR 断片を一本鎖に変性した上でグリセロール加アクリルアミドゲルに泳動する。遺伝子変異が存在する断片では二次構造が変化し、泳動度に差ができることを利用し異常構成体を検出する。検出感度は高く PCR 産物の大きさが 200bp 以下であれば1塩基の差も検出できる。

小変異検出のため我々も PCR-SSCP 法を導入した。泳動時の温度、ゲルの濃度、泳動用緩衝液の濃度、グリセロールの有無、電圧等の条件に試行錯誤が必要であり、温度設定などかなり微妙な設定を要求され、わずかな条件の違いでバンドが異なったパターンになるが、ホモ接合体性 FH19 家系のほぼ全例で少なくとも変異の一方についてエクソンの局在が示唆され本法の有用性を改めて確認できた。

PCR-SSCP 法では変異の確定はできず異常構成体の検出に続きそれが本当に遺伝子変異か、仮に塩基置換が存在してもアミノ酸変異があるか、また変異があっても機能に影響を与えない

遺伝子多型 (ポリモルフィズム, polymorphism) でないか確認しなければならない。

塩基配列決定にあたりクローニングは手技が煩雑で時間がかかりヘテロ接合体性症例の場合評価が難しくなるため、異常構成体の塩基配列の決定には直接塩基配列決定法を用いた。

LDL-R 遺伝子にはシステインなど GC 配列が多く配列内で二次構造を取り易く、高温で反応を行ったがアーチファクトは多く出現した。特にヘテロ接合体性症例のみの FH Kanazawa-2 では変異バンドと二次構造によって生じたダミーバンドとの区別が難しく、変異が疑われる部位について確認の PCR-RFLP 法が必要だった。また結果として両変異とも一塩基の置換であり塩基配列データの解釈は容易であったが、塩基の挿入、欠失等の可能性もあり、その場合直接塩基配列決定法では全く解釈できなくなる。直接塩基配列決定法に時間をかけたうえでクローニングを始めるのでは二重に時間がかかるため、今後の塩基配列決定ではクローニングも並行して行うことが望ましい。

遺伝子変異のスクリーニングのために PCR-RFLP 法を導入した。本来の RFLP 法はゲノム上の制限酵素の切断部位の有無により遺伝子異常を検出する方法で、これでは制限酵素は多数あっても検出できる変異が限定されるのに対し、PCR-RFLP 法は変異プライマーを用いて PCR して強制的に制限酵素の切断部位を導入し、制限酵素で切断して遺伝子変異の有無を知る。これにより変異の確認が簡単にできスクリーニングが容易になる。またホモ接合体性症例、ヘテロ接合体性症例の判別にも有用である。実際には PCR-SSCP 法でスクリーニングし、異常バンドが検出されたら PCR-RFLP で確認するという形式で検索を進めることになるであろう。

FH Tsuruga では LDL-R のアポ B 結合領域のエクソン6に G から T への変異が起り SS 結合を介して蛋白の構造に大きな影響を与えるシステイン (Cysteine, Cys) の隣の280番目のアミノ酸が Asp から Tyr に変異する。変異によって Cys の隣にベンゼン環が挿入されレセプターの構造に歪みを生じると思われる。

現在までに報告されたエクソン6のミスセンス変異を (表8) に示した。総て機能的クラス分類上細胞内転送障害でもレセプターが部分発現を示す細胞内転送障害 2B 型に分類されている。本症例のレセプター活性の結果もレセプター欠損であり<sup>40</sup>、LDL-R の機能的クラス分類上細胞内転送障害、レセプター再利用障害の可能性もある。患者の皮膚線維芽細胞の生育不良でパルス-チェイス法ではデータが出せず確定はできないが<sup>60</sup>細胞内転送障害 2B 型に分類される可能性が高い。

FH Kanazawa-2 では LDL-R の EGF 前駆体相同領域のエク

Table 7. Comparison of lipoprotein profiles among FH Kanazawa-2, FH Tonami-1 and FH-Tonami-2

Mutation	Number of patients	Age (year)	Laboratory data <sup>a)</sup>			
			T-Chol (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)
FH Kanazawa-2	15	40±16	309±45	126±51	35±14	251±43
FH Tonami-1	22	48±19	338±42	97±41	46±12	272±43
FH Tonami-2	34	52±21	310±69	158±126	40±11	222±61

<sup>a)</sup>T-Chol, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol (calculated by Friedewald formula). All values are pre-treatment for FH. Values represent the mean±standard deviation. \*\*p<0.01, \*p<0.014.

ソン14に C→T 変異がおこる。Cys 豊富成長因子反復領域の3番目にあたる C リピートをエクソン14がコードし、エクソン14の中には6つ Cys が存在してヘアピンのように、1番目と6番目、2番目と5番目、3番目と4番目の Cys が組になって SS 結合を形成しレセプターの三次構造を規定するわけだが、本変異では3番目の Cys と4番目の Cys の間の664番目のアミノ酸に Pro から Leu への変異が起こりレセプターに歪みをもたらすものと思われる。

LDL-R の機能的クラス分類の上での検討だが、FH Kanazawa-2 にはホモ接合体性症例はおらず変異レセプターの機能評価は困難である。しかし FH Kanazawa-2 は FH Gujerat と同様のレセプターの形態をとるため FH Gujerat と同様に細胞内転送障害 2B 型と考えられた。本症例のレセプター活性の結果もレセプター欠損であり<sup>49</sup> 矛盾しない。

両変異共レセプターの構造の決定に影響するシステインのそばの変異で三次構造を歪め合成途中で排除され細胞内転送障害となるものと思われる。

FH Kanazawa-2 を含め P664L 変異は CpG という遺伝子変異好発部位に起っている。Soutar ら<sup>45</sup> の報告で計5家系が報告されており2家系が Gujerat 出身、2家系がイギリス出身、1家系がノルウェー出身で、Gujerat とノルウェー出身の者が同じハプロタイプであるが、地理的状況よりいづれも別々に変異が起ったものとされている。FH Kanazawa-2 は地理的状況からも、いづれの例とも共通の祖先を有するとは考えにくい。遺伝子変異好発部位であり地理的に離れた場所で別々に変異が起った新変異と考えられた。

異なった場所から同じ点変異が報告された例は表9に示すように4つあるが共通の祖先を有せず、変異が別々のできごととして起ったと考えられるのは今回の例の FH French Canadian-3 と FH Mexico の例があるのみである。本変異の664アミノ酸の位置は特に変異を起し易い遺伝子変異好発部位の一つと考えられた。

遺伝性疾患では遺伝子変異の差異が臨床症状の差異を説明しうるが、症例数の多い FH では変異毎の臨床像の差異を示しやうい<sup>50</sup>。今回は FH Tonami-1, FH Tonami-2, FH Kanazawa-2 のヘテロ接合体性例の3群において、臨床像に有意差を示すことができた。

FH Tonami-1 は細胞膜貫通領域であるエクソン15が欠失するイントロン14からイントロン15に及ぶ 6Kb の欠損でありその臨床像は古典的 FH (classical FH) に近く重症である。対して FH Tonami-2 はアポ蛋白 B の結合領域であるイントロン1からイントロン3に及ぶ 10Kb の欠損であり臨床像は軽症でホモ接合体性例でも積極的治療無しに長寿であることが多い。FH Kanazawa-2 で虚血性心疾患を有するものが19例中9例、CABG を施行されているものが4例、LDL アフェレーシスを施行されているものが3例と重症例が多い。

3変異を比較した結果では3群で(1) T-Chol 値に有意差はない。(2) LDL-C レベルは FH Tonami-1 は FH Tonami-2 より高く、FH Tonami-2 と FH Kanazawa-2 で差はない。(3) HDL-C レベルは FH Tonami-1 は FH Tonami-2 と有意差ないが FH Kanazawa-2 は FH Tonami-1 より低値である。

3群で臨床像の差は T-Chol 値で説明できない。LDL-C レベ

Table 8. Previously described missense mutations in exon 6 of human LDL-receptor gene

Mutation	Codon change	Nucleotide change	LDL-receptor activity (%)	Functional class
FH Greece-2	S265R	AGC→AGA	5-15*	2B
FH Denver-2	D283N	GAC→AAC	5-15	2B
FH Baltimore-1	D283E	GAC→GAG	2-5*	2B
FH Amsterdam	S285L	TCA→TTA	2-5*	2B
FH Tsuruga	D280Y	GAC→TAC	6-8	

\*Compound heterozygote.

Table 9. Same LDL receptor one point mutations detected in the different places of the world

Mutation	Ethnic background	Exon	Codon change	Nucleotide change
FH Kanazawa-2	Japanese	14	P664L	CCG → CTG
FH Gujerat	Asian-Indian Italian English Norwegian			
FH French Canadian-3	French	4	E207K	GAG → AAG
FH Mexico	Mexican-American			
FH Africaner-1	Africaner	4	D206E	GAC → GAG
FH Maine	American			
FH J.D.	Syrian	17	Y807C	TAT → TGT
FH Bari	Italian			

ルで FH Tonami-1 が FH Tonami-2 より重症であり, FH Tonami-2 と FH Kanazawa-2 は同程度と予想される. しかし FH Kanazawa-2 は FH Tonami-2 より重症であり, その重症度の差に HDL-C レベルの差が寄与していると考えられる.

HDL の抗動脈硬化作用は広く認められている<sup>52)~55)</sup>. FH の病態では LDL-C レベルが動脈硬化進展に関与する第一の因子として挙げられるが, 今回のように LDL-C レベルでは有意差のない 2 群で臨床重症度と HDL-C レベルに有意差があることは FH の動脈硬化の進展における HDL の関与を考える上で重要と考える. LDL-R の変異の差で HDL-C 値の差を説明しうるかは今後の検討問題である.

FH Tsuruga は他の家系には見いだされず比較的最近に起った変異と考えられ, 近親婚の多い狭い領域に症例が分布しているものと推測された.

Table 10. Frequencies of LDL-receptor mutations in Hokuriku district according to the result of mutation screening of 200 families

Mutation	Families	Frequency (%)
FH Tonami-1	10	5.0
FH Tonami-2	11	5.5
FH Okayama	2	1.0
FH Kanazawa-1	1	0.5
FH Tsuruga	1	0.5
FH Kanazawa-2	6	3.0
FH Morioka	1	0.5
Total	32	16.0

FH Kanazawa-2 は FH 全体の約 3% を説明し得ると考えられ比較的頻度が高い変異である. FH Gujerat はロンドン周辺での調査で約 2% を説明すると考えられ FH Kanazawa-2 の方が同時期かやや早い時期に変異を起したものと考えられた. 少なくともこれまでに確定された 7 変異で北陸に存在するヘテロ接合体性 FH の 16% は説明がつくようになった (表10).

今回は現在検索中のホモ接合体性 FH のうち配列決定まで終了した 2 例を示したが, 他の症例も片方の変異のエクソンの局在については見当がつけられた (表11). その結果では変異にエクソンの偏りはなく, 創始者遺伝子効果 (founder gene effect) が作用して単一の変異が大半を占めること<sup>56)</sup>もなさそうである. 日本人の FH における遺伝子変異は多様との印象が強い. フィンランドでは FH Helsinki と FH North Kerelia で FH 全体の約 67% を占める<sup>57)</sup>が日本人の FH には普遍的遺伝子変異 (common mutation) は存在しないようである.

## 結 論

ホモ接合体性家族性高コレステロール血症における LDL 受容体遺伝子変異を PCR-SSCP 法, 直接塩基配列決定法と PCR-RFLP 法により検討し以下の結果を得た.

1. FH Tsuruga: 本変異は LDL-R のアポ B 結合領域であるエクソン 6 の 280 番目のアミノ酸に対応する塩基配列が GAC から TAC へと変化しそれに伴いアスパラギン酸からチロシンへとアミノ酸変異して起こる新しいタイプの変異であると確認された. レセプター活性の結果等より細胞内転送障害 2B 型の変異と推測された. 本変異は発端者の家系以外には見いだされず比較的新しく起きた変異と推定された.

2. FH Kanazawa-2: 本変異は LDL-R の EGF 前駆体相同

Table 11. Previously confirmed mutations of patients with homozygous FH in Hokuriku district according to polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP)

Patient number	Name of patient	Age (year)	Sex <sup>a)</sup>	Mutation	Comments
1	M. T.	33	M	FH Kanazawa-2	Compound heterozygote
	A. T.	23	M	FH Kanazawa-2	Compound heterozygote
2	Y. I.	52	F	FH Tonami-2	True homozygote
	T. T.	54	M	FH Tonami-2	True homozygote
3	Y. S.	22	F	Exon 11?	
4	H. Y.	37	F	FH Tonami-2	True homozygote
5	S. Y.	45	M	FH Tsuruga	True homozygote
6	A. S.	38	F	Exon 9 (N412H)	True homozygote
7	?	25	M		
8	K. M.	52	M	Exon 13?	
9	T. K.	20	M	Exon 4	Compound heterozygote
10	K. T.	39	M	Exon 10	
11	F. T.	30	F	Exon 7	
12	M. K.	40	F	FH Tonami-2	True homozygote
13	A. Y.	34	M	Exon 12	True homozygote
14	N. N.	69	F	FH Morioka	True homozygote
15	G. E.		M	Deletion?	
16	S. H.		F	Exon 4	
17	A. T.	25	F	Exon 7	
18	N. Y.	38	F	Exon 12	Compound heterozygote
19	M. M.	36	M	Exon 2	Compound heterozygote

<sup>a)</sup> M, male; F, female.

領域のエクソン14の664番目のアミノ酸に対応する塩基配列 CCG が CTG に変化しアミノ酸にプロリンからロイシンへの変異が起こるものと確認された。同変異は既に報告のある FH Gujerat と同じ型の変異であるがハプロタイプは異なり新変異と考えられた。また FH Gujerat と同じ細胞内転送障害 2B 型の変異と考えられた。同変異はスクリーニング対象の200家系のヘテロ接合体性 FH 症例の中で6家系に見いだされ FH 全体の約3%を説明しうるものと考えられた。またその臨床像は FH Tonami-1, FH Tonami-2 と比較した場合 HDL-C 低値の傾向にありそれが臨床的重症度に関与しているものと推測された。

3. 他の LDL 受容体遺伝子変異について: これまでに確定された7変異により北陸の FH の約16%が説明できるものと考えられた。PCR-SSCP による変異の存在するエクソンの検討より日本人の FH における LDL-R 遺伝子変異の多様性が確認された。

#### 謝 辞

稿を終えるに臨み御指導御校閲を賜りました恩師竹田亮祐教授に深甚なる謝意を表します。また本研究を当初より直接御指導、御教示頂きました金沢大学医学部内科学第二講座馬淵 宏助教授ならびに小泉順二講師、梶波康二博士、稲津明広博士に心から謝意を表します。また多大なる御協力を頂きました金沢大学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 の採取に際し御協力を頂いた山本幸夫氏に感謝致します。

本研究の一部は第25回日本動脈硬化学会総会(平成5年5月19-20日)および平成5年度日本動脈硬化学会冬季大会(平成5年11月24-25日)において発表した。

#### 文 献

- 1) Goldstein, J. L. & Brown, M. S.: Familial hypercholesterolemia. *In* C. R. Scriver, A. L. Baudet, W. S. Sly, D. Valle, J. B. Stanburg, J. B. Wyngaarden & D. S. Fredrickson (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th ed. P.1215-1250, McGraw-Hill Book Co., New York, 1989.
- 2) Lindgren, V., Luskey, K. L., Russell, D. W. & Francke, U.: Human genes involved in cholesterol metabolism: Chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy 3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 8567-8571 (1985).
- 3) Südhof, T. C., Goldstein, J. L., Brown, M. S. & Russell, D. W.: The LDL receptor gene: A mosaic of exons shared with different proteins. *Science*, 228, 815-822 (1985).
- 4) Südhof, T. C., Russell, D. W., Goldstein, J. L. & Brown, M. S.: Cassette of eight exons shared by genes for LDL receptor and EGF precursor. *Science*, 228, 893-895 (1985).
- 5) Goldstein, J. L. & Brown, M. S.: The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann. Rev. Biochem.*, 46, 897-930 (1977).
- 6) Goldstein, J. L. & Brown, M. S., Anderson, R. G.W., Russell, D. W. & Schneider, W. J.: Receptor-mediated endocytosis: Concepts emerging from the LDL receptor system. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 1, 1-139 (1985).
- 7) Mabuchi, H., Tatami, R., 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).
- 8) 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).
- 9) Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Register Group: Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *BMJ*, 303, 893-896 (1991).
- 10) Mabuchi, H., Tatami, R., Haba, T., Ueda, K., Ueda, R., Kametani, T., Itoh, S., Koizumi, J., Ohta, M., Miyamoto, S., Takeda, R. & Takeshita, H.: Homozygous familial hypercholesterolemia in Japan. *Am. J. Med.*, 65, 290-297 (1978).
- 11) Goldstein, J. L. & Brown, M. S.: Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation*, 76, 504-507 (1987).
- 12) Yamamoto, T., Davis, C. G., Brown, M. S., Schneider, W. J., Casey, M. L., Goldstein, J. L. & Russell, D. W.: The human LDL receptor: A cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its RNA. *Cell*, 39, 27-38 (1984).
- 13) Southern, E.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517 (1975).
- 14) Mabuchi, H., Kajinami, K., Fujita, H., Koizumi, J. & Takeda, R.: Mutations in the low density lipoprotein receptor gene in Japanese patients with familial hypercholesterolemia. *Annals of the New York Acad. Sci.*, 598, 393-397 (1990).
- 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. Intern. 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.*, **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) Engelke, D. R., Hoener, P. A. & Collins, F. S.: Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 544-548 (1988).
- 25) Higuchi, R., von Beroldingen, C. H., Sensabaugh, G. F. & Erlich, H. A.: DNA typing from single hairs. *Nature*, **332**, 543-546 (1988).
- 26) Ballabio, A., Gibbs, R. A. & Caskey, C. T.: PCR tests for cystic fibrosis detection. *Nature*, **343**, 220 (1990).
- 27) Sarkar, G., Cassady, J., Bottema, C. & Sommer, S.: Characterization of polymerase chain reaction amplification of specific alleles. *Analyt. Biochem.*, **186**, 64-68 (1990).
- 28) Sorscher, E. J. & Huang, Z.: Diagnosis of genetic disease by primer specified restriction map modification, with application to cystic fibrosis and retinitis pigmentosa. *Lancet*, **337**, 1115-1118 (1991).
- 29) 馬淵 宏, 多々見良三, 上田幸生, 上田良成, 羽場利博, 亀谷富夫, 伊藤清吾, 小泉順二, 宮元 進, 太田正之, 竹田亮祐, 竹越忠美: 日本人の家族性高コレステロール血症の診断基準について. 日老医誌, **14**, 475-479 (1977).
- 30) Vandenplas, S., Wild, I., Rabie, A. G., 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).
- 31) Leitersdorf, E., Tobin, E. J., Davignon, J. & Hobbs, H. H.: Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population. *J. Clin. Invest.*, **85**, 1014-1023 (1990).
- 32) Beaucage, S. L. & Caruthers, M. H.: Deoxynucleoside phosphoramidites—a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **22**, 1859-1862 (1982).
- 33) Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A.: Analysis of enzymatically amplified  $\beta$ -globin and HLA-DQA DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, **324**, 163-166 (1986).
- 34) Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 5463-5467 (1977).
- 35) Gibbs, R. A., Nguyen, P. N., McBride, L. J., Koepf, S. M. & Caskey, C. T.: Identification of mutations leading to the Lesch-Nyhan syndrome by automated direct DNA sequencing of in vitro amplified cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 1919-1923 (1989).
- 36) Edwards, A., Voss, H., Rice, P., Civitello, A., Stegemann, J., Schwager, C., Zimmermann, J., Erfle, H., Caskey, C. T. & Ansorge, W.: Automated DNA sequencing of the human HPRT locus. *Genomics*, **6**, 593-608 (1990).
- 37) Havel, R. J., Eder, H. J. & Bragdon, J. H.: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, **34**, 1345-1353 (1955).
- 38) Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, S. G., Richmond, C. W. & Fu, P. C.: Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, **20**, 470-475 (1974).
- 39) Bucolo, G. & David, H.: Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin. Chem.*, **19**, 476-482 (1973).
- 40) Irish, G. R., Barrantes, D. M. & Ledue, T. B.: Immunoturbidimetry of apolipoprotein B in human serum. *Clin. Chem.*, **33**, 1267 (1968).
- 41) Bursterin, M. & Scholnich, H. R.: Lipoprotein-polyanionmetal interactions. *Adv. Lipid Res.*, **11**, 67-108 (1973).
- 42) Friedewald, W. T., Levy, R. I. & Frederickson, D. S.: Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.*, **18**, 499-502 (1972).
- 43) Soutar, A. K., Knight, B. L. & Patel, D. D.: Identification of a point mutation in growth factor repeat C of the low density lipoprotein-receptor gene in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia that affects ligand binding and intracellular movement of receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 4166-4170 (1989).
- 44) Knight, B. L., Gavigan, S. J. P., Soutar, A. K. & Patel, D. D.: Defective processing and binding of low-density lipoprotein receptors in fibroblasts from a familial hypercholesterolemic subject. *Eur. J. Biochem.*, **179**, 693-698 (1989).
- 45) King-Underwood, L., Gudnason, V., Humphries, S., Seed, M., Patel, D., Knight, B. & Soutar, A.: Identification of the 664 proline mutation in the low density lipoprotein receptor in four unrelated patients with familial hypercholesterolemia in the UK. *Clin. Genet.*, **40**, 17-28 (1991).
- 46) Mabuchi, H., Michishita, I., Sakai, Y., Sakai, T., Ikawa, T., Genda, A. & Takeda, R.: Coronary ectasia in a homozygous patient with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **59**, 43-46 (1986).
- 47) Hobbs, H. H., Russell D. W., Brown, M. S. & Goldstein, J. L.: The LDL receptor locus in the familial hypercholesterolemia: Mutational analysis of a membrane protein. *Annu. Rev. Genet.*, **24**, 133-170 (1990).
- 48) Hobbs, H. H., Brown, M. S. & Goldstein, J. L.: Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Human Mutation*, **1**, 445-466 (1992).
- 49) Haba, T., Mabuchi, H., Yoshimura, A., Watanabe,

- A., Wakasugi, T., Tatami, R., Ueda, K., Ueda, R., Kametani, T., Koizumi, J., Miyamoto, S. & Takeda, R.: Effect of ML-236B (Compactin) on sterol synthesis and low density lipoprotein receptor activities in fibroblasts of patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Clin. Invest.*, **64**, 1532-1540 (1981).
- 50) 藤田 一: 家族性高コレステロール血症における低比重リポ蛋白受容体生成に関する研究. 十全医会誌, **99**, 302-314 (1990).
- 51) Moorjani, S., Roy, M., Torres, A., Betard, C., Gagni, C., Lambert, M., Brun, D., Davignon, J. & Lupien, P.: Mutations of low-density-lipoprotein-receptor gene, variation in plasma cholesterol, and expression of coronary heart disease in homozygous familial hypercholesterolemia. *Lancet*, **341**, 1303-1306 (1993).
- 52) Slyper, A. H.: A fresh look at the atherogenic remnant hypothesis. *Lancet*, **340**, 289-291 (1992).
- 53) Tall, A. R. & Small, D. M.: Plasma high-density lipoproteins. *N. Engl. J. Med.*, **299**, 1232-1236 (1978).
- 54) Abott, R. D., Wilson, P. W. F., Kannwl, W. B. & Castelli, W. P.: High density lipoprotein cholesterol, total cholesterol screening, and myocardial infarction, The Framingham study. *Arteriosclerosis*, **8**, 207-211 (1988).
- 55) Silveman, D. I., Ginsburg, G. S. & Pasternak, R. C.: High-density lipoprotein subfractions. *Am. J. Med.*, **94**, 636-645 (1993).
- 56) Wang, T., Okano, Y., Eisensmith, R. C., Harvey, M. L., Lo, W. H. Y., Huang, S. Z., Zeng, Y. T., Yuan, L. F., Furuyama, J., Oura, T., Sommer, S. S. & Woo, S. L. C.: Founder effect of a prevalent phenylketonuria mutation in the oriental population. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 2146-2150 (1991).
- 57) Koivisto, U. M., Turtola, H., Aalto-Setälä, K., Top, B., Frants, R. R., Kovanen, P. T., Syvanen, A. C. & Kontula, K.: The familial hypercholesterolemia (FH)-North Karelia mutation of the low density lipoprotein receptor gene deletes seven nucleotides of exon6 and is a common cause of FH in Finland. *J. Clin. Invest.*, **90**, 219-228 (1992).

#### Low-Density Lipoprotein Receptor Mutations in Homozygous Patients with Familial Hypercholesterolemia

Kunimasa Yagi, Department of Internal Medicine (II) School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. Juzen Med Soc., **103**, 81-95 (1994)

**Key words** homozygous familial hypercholesterolemia, polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism, direct sequencing, FH Tsuruga, FH Kanazawa-2

#### Abstract

Familial hypercholesterolemia (FH) results from mutations in the low density lipoprotein receptor (LDL-R) gene, and is accompanied by coronary atherosclerosis. Homozygous patients with FH usually die of coronary heart disease at about 26 years of age. In the homozygous patients, early diagnoses based on gene analysis are required to prevent premature coronary atherosclerosis by early introduction of intensive cholesterol-lowering therapy. Twenty-one homozygous patients with FH from nineteen families were studied for the analysis of LDL-R gene. Genomic DNA samples were obtained from the peripheral WBC of the patients. Each 18 exon of the LDL-R gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with 19 pairs of oligonucleotide primers. Variant conformers were detected by PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). Subsequent direct sequencing of the PCR products confirmed their mutations. Thereby, two new point mutations in the LDL-R gene were identified; one was a G-to-T mutation in the exon 6 of LDL-R gene, resulting in amino acid substitution of Asp to Tyr at the codon 280 (D280Y), and the other was a C-to-T mutation in the exon 14 of LDL-R gene, resulting in amino acid substitution of Pro to Leu at the codon 664 (P664L). These mutations were named FH Tsuruga and FH Kanazawa-2, respectively, after the districts where their probands originated. Screening studies of the mutations in the proband's family members and 200 unrelated heterozygous FH were performed through PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). In the FH Tsuruga, the proband was the true homozygote with this mutation, and his elder brother was the heterozygote. No other family members with this mutation and his elder brother was the heterozygote. No other family members with this mutation were identified. The nucleotide substitution in FH Kanazawa-2 was the same change as that in FH Gujerat, but the haplotype of the LDL-R gene in FH Kanazawa-2 revealed that it derived from independent mutational events. The proband and his elder brother were clinically compound heterozygotes with FH Kanazawa-2 from the paternal side and another unknown mutant. The screening studies indicated that 19 patients from 6 unrelated families with this mutation originated in the northern part of Kanazawa city. As the HDL-cholesterol levels in FH Kanazawa-2 were low in comparison with FH Tonami-1 and FH Tonami-2 and many of the patients with FH Kanazawa-2 accompanied advanced coronary heart disease, FH kanazawa-2 was considered as a severe type of FH. The results of PCR-SSCP analysis suggested a high mutational heterogeneity in LDL-R gene mutations in FH in the Hokuriku district of Japan.