

Mutation in the Low Density Lipoprotein Receptor Gene in Familial Hypercholesterolemia

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7984

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

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

梶 波 康 二

(昭和62年11月5日受付)

家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia, FH) における低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 受容体の異常につき、その遺伝子レベルからの検討を行った。対象者の末梢白血球から分離した高分子 DNA を制限酵素で切断し、ヒト LDL 受容体遺伝子の相補鎖 DNA (complementary DNA, cDNA) をプローブとして Southern blotting を行った。まず制限酵素 Pvu II による多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) に関し、ヘテロ接合体性 FH と正常対照者とを比較検討した。その結果、両群間で allele の頻度に差はなく、この RFLP と本症発症との因果関係は否定的であった。また既報の結果との間にも差は認められず、この RFLP に関して人種差はないと思われた。引き続き 40 例のヘテロ接合体性 FH の LDL 受容体遺伝子に、大きな欠損や挿入がないかを調べた。その結果、過去 100 年間はつながりのない 3 家系において、約 6 キロ塩基対の欠損を持つ異常遺伝子を見出した。これは LDL 受容体遺伝子のうち第 15 エクソンと隣接するイントロンの一部を欠落するもので、既報の成績との比較により、全く新しいタイプの遺伝子異常と判明した。各家系内で、この異常遺伝子は全ての本症患者に受け継がれており、この遺伝子異常が本症発症の原因と考えられるとともに、これら 3 家系は共通の祖先を持つと思われた。またそのうちの 1 家系では、新生児 2 例の臍帯血を分析し、遺伝子異常の有無から本症の出生時診断が可能であった。残る 37 家系では遺伝子上の大きな変化はなかった。これは本症の遺伝子異常の大多数が、1 ないしは数塩基の異常であることを示唆するものであった。このような例の中には、複数の RFLP の組み合わせにより異常 allele が同定できる例があり、その場合これを利用して本症の遺伝子診断が可能になると思われた。

Key words familial hypercholesterolemia, low density lipoprotein receptor, gene mutation, restriction fragment length polymorphism, neonatal diagnosis

家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia, FH) は常染色体優性遺伝の疾患である。本症は低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 受容体の異常により発症することが既に明らかにされている¹⁾²⁾。FH の臨床症状としては、アキレス腱をはじめとする黄色腫³⁾や著明な高 LDL コレステロール血症⁴⁾⁵⁾が特徴的である。しかも早発性冠動脈病変を高率に合併することが指摘されており、LDL コレ

ステロールと動脈硬化性病変との関連が明らかである⁶⁾。また FH の一般人における頻度はホモ接合体性では 100 万人に 1 人、ヘテロ接合体性では 500 人に 1 人と極めて高いことから⁴⁾も本症の病態解明や治療法の開発、さらには早期診断による予防的治療が強く求められて来た。

近年の分子生物学の発展に伴い、遺伝性疾患における遺伝子異常に対して新たなアプローチが試みられて

Abbreviations: cDNA, complementary DNA; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid 2 Na; FH, familial hypercholesterolemia; kb, kilobase pairs; LDL, low density lipoprotein; RFLP, restriction fragment length polymorphism; Tris, Tris [hydroxymethyl] amino-methane.

きた⁷⁻⁹⁾。1983年ウシの^{10,11)}、そして1984年ヒトの¹²⁾ LDL受容体遺伝子の相補鎖DNA (complementary DNA, cDNA) がクローン化されたことにより、LDL受容体に関しても遺伝子レベルでの解析が可能になった。それによると、LDL受容体遺伝子は第19番染色体の短腕近位部 (p13.1-p13.3) に存在¹³⁾し、全長約45キロ塩基対 (kilobase pairs, kb) で18のエクソンから成る^{14,15)}ことがわかっている。FHのLDL受容体異常は、培養細胞系におけるその障害部位から蛋白レベルでは、①蛋白がまったく生成されないもの、②生成された蛋白の細胞膜表面への移動が障害されているもの、③細胞膜表面でのLDLとの結合が障害されているもの、④結合したLDLを細胞内へ取り込む段階が障害されているものといった4つに大別されており¹⁶⁾、本症における遺伝子レベルの異常が多様であることを示唆している。本研究の第1の目的は、FHにおけるこのようなLDL受容体遺伝子の異常を明らかにすることである。

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り、明確な診断が困難な症例も多く、異常の本態に迫る遺伝子レベルからの検討が待たれていた。また、コレステロール生合成の律速酵素である3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A還元酵素の選択的阻害の開発は、今まで困難であったFHの治療を現実のものとし¹⁷⁻¹⁹⁾、本症患者において早期治療が可能となった。このような理由からFHの遺伝子診断の意義は高く、その可能性の検討が本研究の第2の目的である。

対象および方法

I. 対 象

問診上異なる家系に属すると考えられるヘテロ接合体性FH 40例およびその家系の構成員を対象とした。本症の診断は、馬淵ら²⁰⁾の基準に基づいて行った。即ち、①血清総コレステロールが250 mg/dl以上で、腱黄色腫またはアキレス腱黄色腫を認めること、②一親等に本症があり、血清総コレステロールが250 mg/dl以上であることのいずれかを満足していた。また正常対照群として、正脂血症者13例を選んだ。この群は、虚血性心疾患・肝疾患・腎疾患・内分泌疾患・+10%以上の肥満・糖尿病を有さず、早朝空腹時の血清総コレステロール濃度220 mg/dl以下、血清トリグリセライド濃度180 mg/dl以下であることを満足していた。

II. 方 法

1. 高分子DNAの抽出

対象者の末梢静脈血、または分娩時の臍帯血10 mlをヘパリンナトリウムを抗凝固剤として採取し、-

20°Cにて冷凍保存した。この末梢血を室温で解凍後、Triton X-100融解変法²¹⁾にて高分子DNAを単離した。すなわち、320 mM ショ糖、1% Triton X-100、5 mM MgCl₂、10 mM Tris [hydroxymethyl]amino-methane (Tris)、pH 7.6を含む融解液にて赤血球を溶血させ、遠心により沈澱として白血球を集めた。これをプロテアーゼ (シグマ社、アメリカ) にて、消化後、フェノール・クロロホルム (1:1) で1回、続いてクロロホルム・イソアミルアルコール (24:1) にて2回抽出し、最後にエタノール沈澱を行った。こうして得られたDNAを、10 mM Tris、1 mM ethylenediaminetetraacetic acid 2 Na (EDTA)、pH 8.0に溶解し、260 nmにおける吸光度の測定によりDNA濃度を求めた。

2. Southernトランスファー

高分子DNA 7ないし10 μgを種々の制限酵素 (宝酒造、京都) にて消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動を行った。その後Southern法²²⁾に準じてトランスファーを行った。即ち、泳動終了後のゲルを0.5 M 水酸化ナトリウム、1.5 M 塩化ナトリウム溶液にひたし30分間室温でゆっくり振とうさせこれを2回行うことでDNAを変性させた。ゲルを蒸留水で水洗後、1 M Tris、1.5 M 塩化ナトリウム、pH 7.4の溶液にひたし30分間2回ゆっくり振とうし中和した。その後5×SSC (20×SSCは3 M 塩化ナトリウム、0.3 M クエン酸3ナトリウムからなる溶液) にて1度ゲルを洗い、15×SSCを使って平均孔径0.2 μmのニトロセルローズ・フィルター (シュライヒャー・シュエル社、西独) にトランスファーした。

トランスファー後のフィルターは、室温で風乾した後、乾熱機を使って80°Cで3時間ベイキングしDNAを固定した。

3. プローブの作成

ヒトLDL受容体遺伝子のcDNAを含むプラスミド¹²⁾ (pLDLR-3およびpLDLR-2)は、Russellらのグループ (テキサス大学、アメリカ) から提供を受けた。pLDLR-3はその3'側に反復配列であるAluシークエンスを持つ¹²⁾ためそのままではハイブリダイゼーションには適さずこれを除く必要がある (図1)。そのため制限酵素Xba IとSma Iにて切断後、1%アガロースゲル電気泳動にて分離した。そのうち目的とする断片をDE81の濾紙 (ワットマン社、イギリス) に吸着させたのち抽出・精製し、これをpLDLR-3XS Iとした。またこのDNAをさらにXba IとBgl IIで切断して同様に精製したもの (pLDLR-3XB5) も得た。

pLDLR-2はpLDLR-3の一部分、1573番から3486番に相当する1919塩基対からなり、別のベクターであ

るpSP64²³⁾に組み込まれたものである。これをBamHIで切断し、やはりアガロースゲルを使い分離・精製した(pLDLR-2HHI)。

これらのプローブ100 ngをニックトランスレーション²⁴⁾・キット(アマシャム・ジャパン社)で、また25 ngをマルチプライム・ラベリング²⁵⁾・キット(同社)を用いて、それぞれ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ デオキシCTP(同社)にて標識し $2.0\sim 5.0\times 10^8$ cpm/ μg の比活性を持つプローブを得た。

4. ハイブリダイゼーション

DNAを固定したニトロセルロース・フィルターを、50%脱イオン化ホルムアミド、 $3\times\text{SSC}$ 、 $20\mu\text{g/ml}$ 変性サケ精子DNA、 $5\times$ デンハルト液($50\times$ デンハルト液は1%フィコール、1%ポリビニールピロリドリン、1%ウシアルブミンからなる溶液)、10%デキストラン硫酸を含む溶液10 mlとともにプラスチックバックに入れ、 42°C にて数時間プレ・ハイブリダイゼーションを行った。その後この溶液中に、サケ精子DNA $50\mu\text{g}$ と標識したcDNA(25ないし100 ng)を各々熱変性後に加え、さらに15ないし20時間 42°C にてハイブリダイゼーションを行った。

次にこのフィルターを $3\times\text{SSC}$ を用い5分間室温で2回洗った。さらに $3\times\text{SSC}$ 、1%ドデシル硫酸ナトリウム液にて 50°C 10分間の洗いを2回行い、最後に室温にて $3\times\text{SSC}$ で10分間洗った。室温にて乾燥後、 -80°C にて約48時間のオートラジオグラフィーを行った。検出される断片の大きさの評価は、アガロースゲル電気泳動の際にHind IIIで切断した λ DNA約 $1\mu\text{g}$ を標準として同時に泳動し、その位置から計算した。

5. 血清脂質の分析

対象者は16時間絶食後の早朝空腹時に採血した。リポ蛋白の超遠心分析は、Havelら²⁶⁾の方法に従ってベックマン社(アメリカ)製超遠心機L8-55および同社製ローター50.3Tiを用いて行った。

血清および各リポタンパク分画の総コレステロール²⁷⁾はデタミネーTC(協和メデックス、東京)、リン脂質²⁸⁾はPLキットK(大日本商事、大阪)、トリグリセライド²⁹⁾はリピドス・エース(東洋紡、大阪)を用いすべて酵素法にて測定した。

臍帯血は、分娩時に産科医の協力を得て母体血と混和しないように採血し、血清を同様に分析した。

6. 総計処理は、 χ^2 検定にて行った。

成 績

I. 制限酵素 Pvu II による多型性

ヒトLDL受容体遺伝子は制限酵素Pvu IIにより多型性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)を示すことが知られている³⁰⁾³¹⁾。これはLDL受容体遺伝子の第15イントロンの3'側に、グアニン(G)またはアデニン(A)という塩基のバリエーションを示す部位があり、GならばPvu IIで切断されずAならば切断されるためである。pLDLR-2HHIをプローブとしてハイブリダイゼーションを行うと、切断が起こらない場合は16.5 kbおよび3.5 kbの断片として検出される(allele A)。一方切断される場合は14.0, 3.5, 2.5 kbの各切断が認められる(allele B)(図2)。

このPFLPと家族性高コレステロール血症の発症との関連性を検討するため、ヘテロ接合体性家族性高

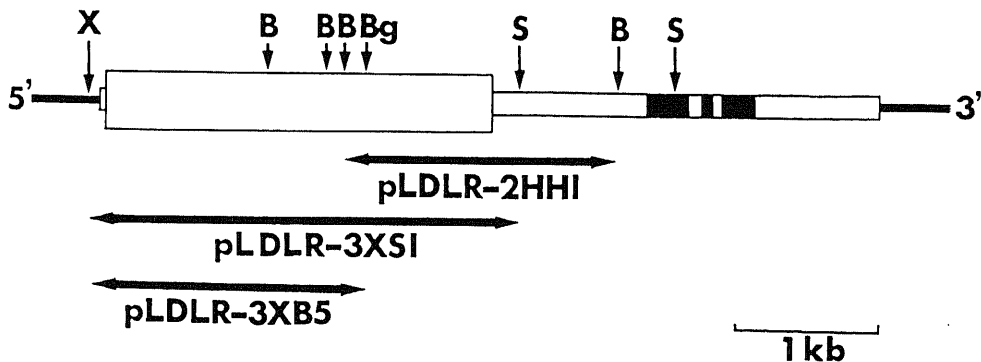


Fig. 1. Restriction map of a full length cDNA for human LDL receptor (pLDLR-3)¹²⁾ and cDNA probes used in the present study. The black line represents the vector DNA of this clone. The wide open bar indicates the coding region and narrow portions indicate the non-coding regions. The solid boxes represent the Alu-repeat sequences. B, Bam HI site; Bg, Bgl II site; S, Sma I site; X, Xba I site.

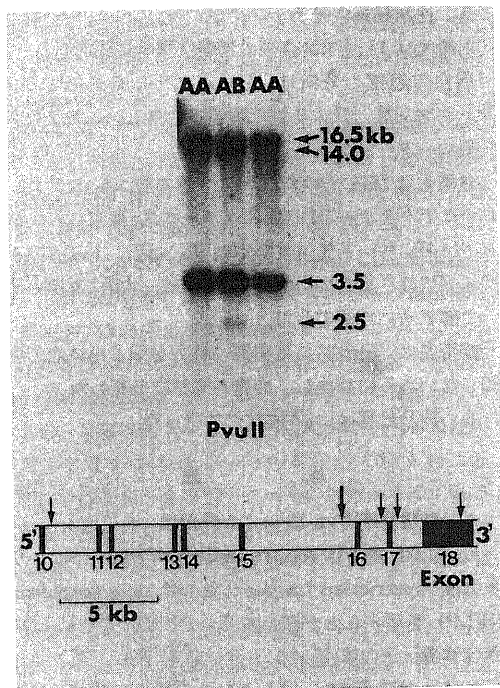


Fig. 2. Restriction fragment length polymorphism of LDL receptor gene with Pvu II. Southern blotting of Pvu II digested three samples from normal subjects and restriction map of the 3' end of LDL receptor gene are shown. The Pvu II recognition sites are indicated by arrows in restriction map. The allele not cleaved at polymorphic Pvu II site (indicated by the large arrow) produces 16.5 and 3.5 kb fragments and designated 'allele A'. The allele cleaved at polymorphic site produces 14.0, 3.5 and 2.5 kb fragments and designated 'allele B'. The genotype of these three samples are shown at the top of the autoradiograph.

コレステロール血症 28 例と正常対照群 13 例について解析した。その結果は表 1 に示した。それによると、遺伝子型として AA, AB, BB の 3 種が認められたが、正常対照群では BB の型は認められなかった。両群間での各遺伝子型の分布に関し有意差は認められなかった。引き続き各遺伝子型の分布から allele A, B の頻度を各々計算しそれらを表 2 に示した。両群間で allele の頻度に有意差はなく、また既報の結果³⁰⁾³¹⁾との間にも有意差は認めなかった。

II. 遺伝子異常の検討

1. 異常断片の検出

pLDLR-2HH I をプローブとして制限酵素 Pvu II または BamHI で切断し、LDL 受容体遺伝子に大きな欠損や挿入がないかを検討した。その結果家系の異なる 40 例のヘテロ接合体性 FH の中で、3 例においてのみ異常断片を認めた。

第 1 例 (S.O.) および第 2 例 (K.Y.) の比較検討結果を図 3 に示した。BamHI 切断では正常対照者は 16.0 kb 断片のみが認められるが、両症例ではさらに

Table 1. Comparison of genotype distribution in familial hypercholesterolemic (FH) patients and normal control subjects

	Genotype		
	AA	AB	BB
FH	22	5	1
Normal	11	2	0

The difference of genotype distribution between familial hypercholesterolemia (FH) and normal subjects is not significant.
 $\chi^2 = 0.536 < \chi^2 (0.05) = 5.99$

Table 2. Comparison of allele frequencies of Pvu II RFLP of LDL receptor gene

	FH		Normal	
	A	B	A	B
This study*	49/0.857	7/0.125	24/0.923	2/0.077
Humphries et al [#]	56/0.82	16/0.18	95/0.77	29/0.23
Hobbs et al ⁺			29/0.764	9/0.236

All results were indicated as numbers of alleles/allele frequencies.

*: In this study, the difference of allele frequency between familial hypercholesterolemia (FH) and normal subjects is not significant. $\chi^2 = 0.072 < \chi^2 (0.05) = 3.84$

[#]: The differences between this study and Humphries' report³⁰⁾ in FH ($\chi^2 = 0.85$) and in normal subjects ($\chi^2 = 2.12$) are not significant, respectively.

⁺: The difference between this study and Hobbs' report³¹⁾ in normal subjects is not significant ($\chi^2 = 1.76$).

10.0 kbの異常断片が認められ、それらは16.0 kb断片とほぼ同等の濃さであった。またBamHIとPvu IIの重複切断でも、対照例で見られる14.0 kb断片より約6 kb短い異常断片が両症例ともに認められた。またこのフィルターを、pLDLR-3XS Iをプローブとして再度ハイブリダイゼーションしても、図3で認められたもの以外に異常断片は認めなかった。図4には第3例(H.Y.)の検討結果を示した(Pvu IIのみ)。本例においてもBamHIとの重複切断を行ったが、第1例、第2例の結果(図3)と同様であった。残る37例では異常断片を認めなかった。

2. 異常遺伝子断片の分析

以上からS.O.・K.Y.・H.Y.の3症例は共通の異常断片を示しており、それは約6 kbの欠損遺伝子に由

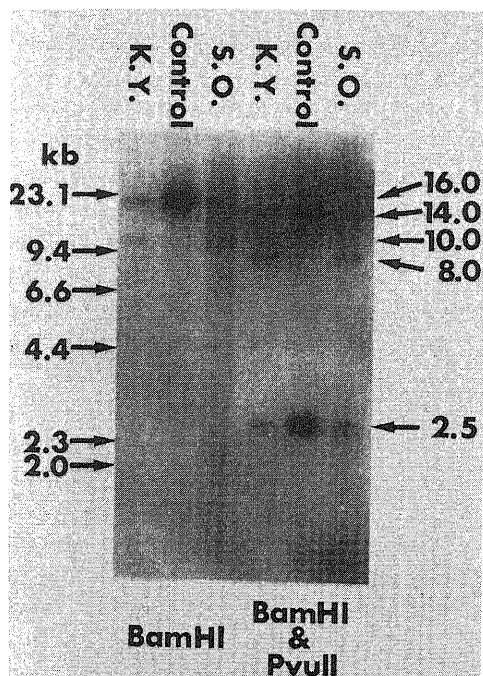


Fig. 3. Detection of an abnormal fragment of LDL receptor gene with a 6 kilobase deletion. Autoradiograph after BamH I digestion and BamH I-Pvu II double digestion hybridized with pLDLR-2HHI. With BamH I, K.Y. and S.O. have abnormal fragment approximately 10.0 kb length. After BamH I-Pvu II double digestion, the difference in fragment size between the abnormal fragment (8.0 kb) and the normal one (14.0 kb), 6 kb, is also identified same as after BamH I digestion. The fragment sizes indicated at the left side of the autoradiograph are derived from Hind III digested λ DNA fragments.

来すると思われた。その詳細な検討をS.O.を対象として行った。即ちpLDLR-2HH Iをプローブとして用い、切断する制限酵素を① BamH I単独・② BamH I + Hind III・③ BamH I + Xba I・④ BamH I + Kpn Iと変化させ、各々正常対照例とともに泳動しハイブリダイゼーションを行った(図5)。

その結果、BamH I単独で見られる異常断片はXba Iを追加すると約5 kb短くなるものの依然存在し、正常断片との差はやはり約6 kbであった。このことから、異常遺伝子における欠損はBamH I認識部位間(正常なら16.5 kbの距離がある)に位置し、その中でも特にXba I認識部位間に位置すると考えられた。

一方、BamH IにHind III切断を追加しても異常断片の大きさはまったく変化しなかった。これは異常遺伝子にHind III認識部位が存在しないため、すなわち遺伝子欠損の中にHind III認識部位が含まれるためと考えられた。

BamHI+Kpn I切断では正常対照例とS.O.との間にまったく差が認められなかったが、最も大きい約

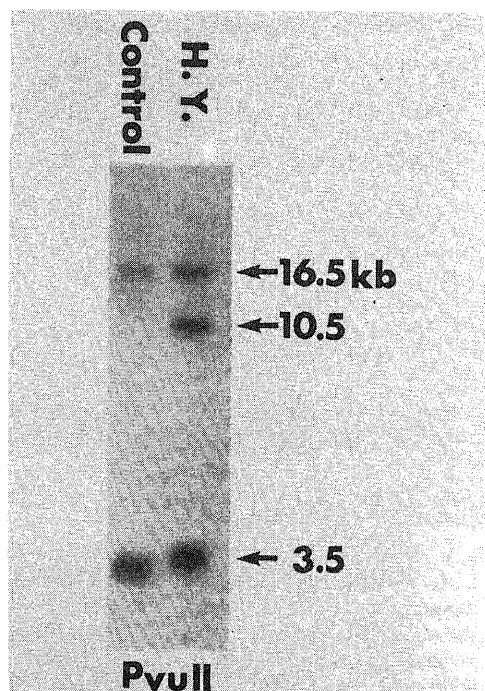


Fig. 4. Detection of the third case showing 6 kb deleted abnormal fragment of LDL receptor gene. Southern hybridization with pLDLR-2HHI after Pvu II digestion is shown. H.Y. shows an additional 10.5 kb fragment same as K.Y. and S.O. (Fig. 3), that is never seen on the lane of control subject.

9 kb の断片の濃さが, S.O. では対照の約半分と思われた。このことから, 異常遺伝子では Kpn I 認識部位は対照と同様に存在するものの, 本来 9 kb の断片として検出されるはずの部分に欠損があると予想された。

以上の結果および Pvu II や EcoRV を使った結果を総合すると, この異常遺伝子は図 6 のような構造であると考えられた。すなわち第 14 イントロンにある Kpn I 認識部位と, 第 15 イントロンの 3' 端にある Xba I 認識部位との間で約 6 kb が欠損しており, それは第 15 エクソンおよび隣接する第 14・第 15 イントロンの一部であると考えられた。

3. 家系調査 その 1

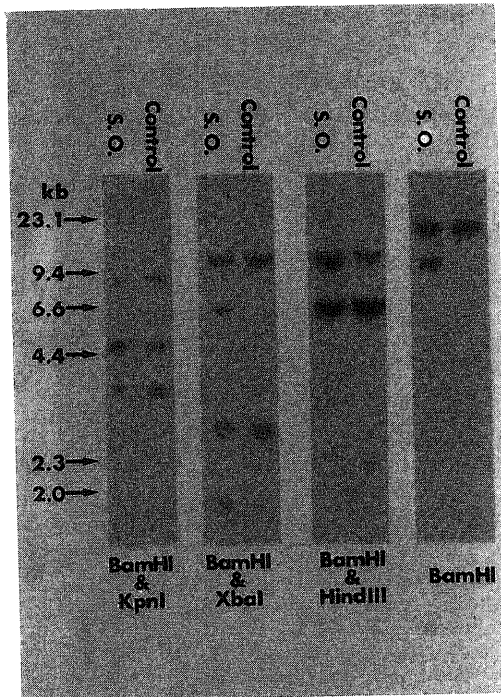


Fig. 5. Determination of the deleted portion in the LDL receptor gene of S.O.. After BamH I digestion and BamH I-Xba I double digestion, the abnormal fragment that is 6 kb smaller than normal one is detected, respectively. But additional Hind III digestion to BamH I digestion produces no change of the abnormal fragment in length. With BamH I and Kpn I, there is no difference between normal and S.O. in the fragment pattern. But the largest fragment on the lane of S.O. shows about half intensity compared with the normal one. The fragment sizes indicated at the left side are derived from λ DNA cleaved by Hind III.

K.Y. についてこの欠損遺伝子と FH 発症との関連性を見るため家系調査を行い, 3 世代 11 例に渡る検討を行った (図 7). BamH I 切断による検討では, 臨床的に本症と診断されていた全例において, 欠損遺伝子を示す 10.0 kb の異常断片を認めた。逆に本症が否定されている例では, 全例 16.0 kb の正常断片のみを認めた。この結果から, 本家系内では約 6 kb の欠損を持つ異常 LDL 受容体遺伝子が FH を引き起こしていると考えられた。

4. 家系調査 その 2

次に S.O. について家系調査を行った。ヘテロ接合体性 FH との臨床診断がなされている娘 2 例 (M.T.・C.M.) にも, S.O. と同じ異常断片を認めた (図 8)。S.O. の夫は正脂血症であり (表 3), 結果は示していないが遺伝子分析では正常断片 (Pvu II で切断すると遺伝子型 AA (図 2)) であったことから, 本家系内でもこの異常 LDL 受容体遺伝子が本症の発症の原因と考えられた。

また今回, M.T. と C.M. とがともに妊娠・分娩を経験したため, 分娩時の臍帯血を対象とし脂質分析 (表 3) と LDL 受容体遺伝子分析 (図 8) を行った。M.T. の子供は臍帯血の血清総コレステロール値が 78 mg/dl と軽度上昇を示し (平均 \pm SEM: 59 ± 14 mg/dl²²), Pvu II を使った遺伝子分析でも M.T. と同じ 10.5 kb の異常断片を認めた。一方 C.M. の子供は, 51 mg/dl と臍帯血の総コレステロール値は正常であり, 遺伝子断片にも異常は認めなかった (遺伝子型 AA)。

5. LDL 受容体遺伝子 5' 側の検討

先に示した pLDLR-2HH I をプローブとした検討では, LDL 受容体遺伝子の 3' 側半分 (第 10 エクソンから第 18 エクソン)¹²⁾¹⁴⁾のみが対象範囲であった。そこで, 制限酵素 EcoRI で切断した高分子 DNA を pLDLR-3XB5 をプローブとして解析することで, 第 1 エクソンから第 10 エクソンまで検討した。10 例のヘテロ接合体性 FH の検討結果では, 全例同じ結果 (9.3 kb, 8.8 kb, 2.4 kb, 1.7 kb の各フラグメントが認められた) を示し, 正常対照例との間に差は認められなかった (図 9)。

III. Restriction site haplotyping

Southern ハイブリダイゼーションにより明らかな異常の認められない症例に関し, その異常遺伝子を同定するがかりとして, RFLP の組み合わせ (ハプロタイピング) を検討した。制限酵素 Nco I を使用すると, 全例において 9 kb および 7 kb の断片が認められる。そして, これらに加えて 13 kb の断片が認められる allele N₁ と, 3.4 kb の断片が認められる allele N₂ とに分けられる³³⁾。図 10 に症例 C.H. の家系を示した。

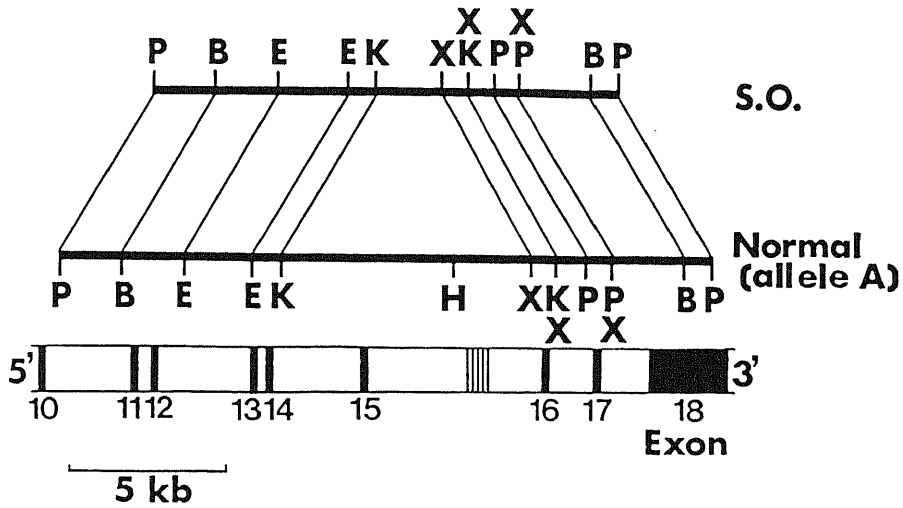


Fig. 6. Comparison of restriction map of the 3' end of the normal LDL receptor gene (allele A) and the 6 kb deleted mutant gene of S.O.. The solid segments and the open segments indicate the exons and the introns, respectively. The Alu-sequence in intron 15 is indicated as shaded area. The map of the normal gene is derived from Stühof et al.¹⁴⁾. B, BamH I site; E, EcoRV site; H, Hind III site; K, Kpn I site; P, Pvu II site; X, Xba I site.

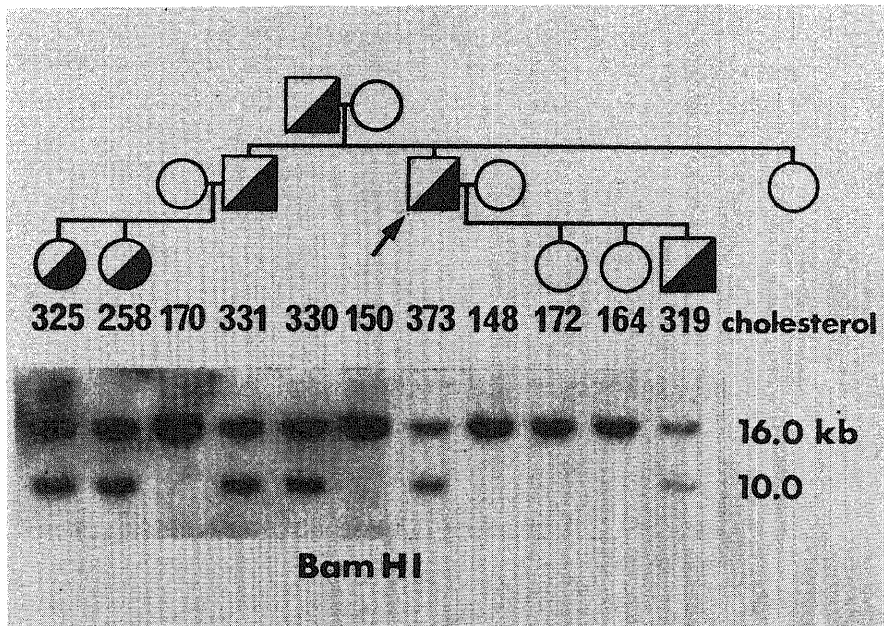


Fig. 7. The analysis of LDL receptor gene in the family of K.Y.. In all patients with heterozygous familial hypercholesterolemia (FH) (◐, ◑), the abnormal fragment (10.0 kb) are found after BamH I digestion hybridized with pLDLR-2HHL. Non-FH members (○) never show this abnormal fragment.

Pvu II による RFLP (図 2) の結果では、ともにヘテロ接合体性 FH である C.H. とその子供の Yk.H. が遺伝子型 AA を示した。また Nco I では、C.H. が $N_1 \cdot N_1$ で Yk.H. が $N_1 \cdot N_2$ であったこれらから C.H. のハプロタイプは AN_1/AN_1 、Yk.H. は AN_1/AN_2 と考えられた。すなわち、Yk.H. は母である C.H. から AN_1 を、父からは AN_2 を受け継いだと考えられた。一方、やはりヘテロ FH である Ya.H. は Pvu II で AA、Nco I で $N_1 \cdot N_2$ を示すため、そのハプロタイプは AN_1/AN_2 と考えられ、やはり母から AN_1 、父から AN_2 を受け継いだと思われた。

考 察

一般に遺伝子における塩基のバリエーションは稀ではなく、それによって制限酵素の切断に差が生ずる、いわゆる site polymorphism に関しても多数例の報告がある²⁾。そしてこのような塩基のバリエーションが実際のアミノ酸配列に変化を起こし、異常蛋白を介して疾患を引き起こした例も報告されている。またこのバリエーションが、蛋白に反映されない領域 (エクソン内の非翻訳領域やイントロン) に起こったとしても、遺伝子発現の調節などに影響を及ぼしている可能性も充分考えられる。このような理由から、RFLP と疾患との関連を検討する意義は高い。

そこで LDL 受容体遺伝子における Pvu II による RFLP と FH 発症との関連性を検討した。本症患者と対照群との間で遺伝子型の分布 (表 1)・allele の頻度 (表 2) とともに、有意差を認めなかった。このことは Pvu II による RFLP と本症発症との因果関係が否定的であることを示唆するものであった。また RFLP

には人種間でその出現頻度に著しい差の見られるもの³⁴⁾もあり、人種の起源についての問題を提起している。今回得られた結果と欧米人を対象とした既報^{30,31)}とを比較検討したが、有意差は認められず、この RFLP に関し日本人と欧米人とに人種差はないと思われた。

異なる家系に属する 40 例のヘテロ接合体性 FH の中で、3 例において共通と思われる LDL 受容体遺伝子の異常を見出した。図 5 に示した詳細な検討の結果、異常遺伝子は約 6 kb の欠損をもち、それにより LDL 受容体遺伝子の 18 個のエクソンのうち第 15 エクソンのみが欠けていた (図 6)。Goldstein らのグループの報告例^{35)~44)}や他の報告例^{45)~48)}と比較したが、この欠損は全く新しいタイプのものであった。

この第 15 エクソンは、LDL 受容体蛋白のうち O-linked sugar domain をコードしている¹⁴⁾が、現在までこの domain の生理的意義は明らかではない。Davis ら⁴⁹⁾は in vitro mutagenesis により部分欠損させた cDNA を培養細胞に移入し、この domain の欠如した LDL 受容体蛋白の性質を検討した。それによると、機能上は正常 LDL 受容体とまったく同じであったという。今回明らかとなった異常遺伝子を持つ 3 家系の FH 患者については、蛋白レベルでの LDL 受容体分析は行っていない。しかし、この domain 持たない蛋白が作られているとすれば、その詳細な検討によりこの domain の果たす役割が明らかになろう。

今までに報告されている LDL 受容体遺伝子異常の中で、大きな欠損や挿入を持つ例のほとんどは、Alu シークエンスまたはそれに類似の反復配列が関与した組み替えによって生じたと考えられている。Lehrman

Table 3. Lipoprotein cholesterol levels of S. O. and other members of her family

Samples	Case	Age	Cholesterol mg/dl				
			Total	VLDL	IDL	LDL	HDL
	S.O.	54	315	6	8	204	62
	Husband	57	194	6	2	91	51
Peripheral blood	M.T.*	26	389	33	28	245	48
	C.M.*	25	393	16	48	281	34
	Control# (n=17)		173±22	10±16	11±7	94±22	57±11
Cord blood	M.T.'s baby	0	78	4		31	38
	C.M.'s baby	0	57	7		19	19
	Control# (n=12)		59±14	2±2		21±8	32±7

*: Blood samples were obtained during their pregnancy.

#: Results were means±standard deviations^{31,32)}.

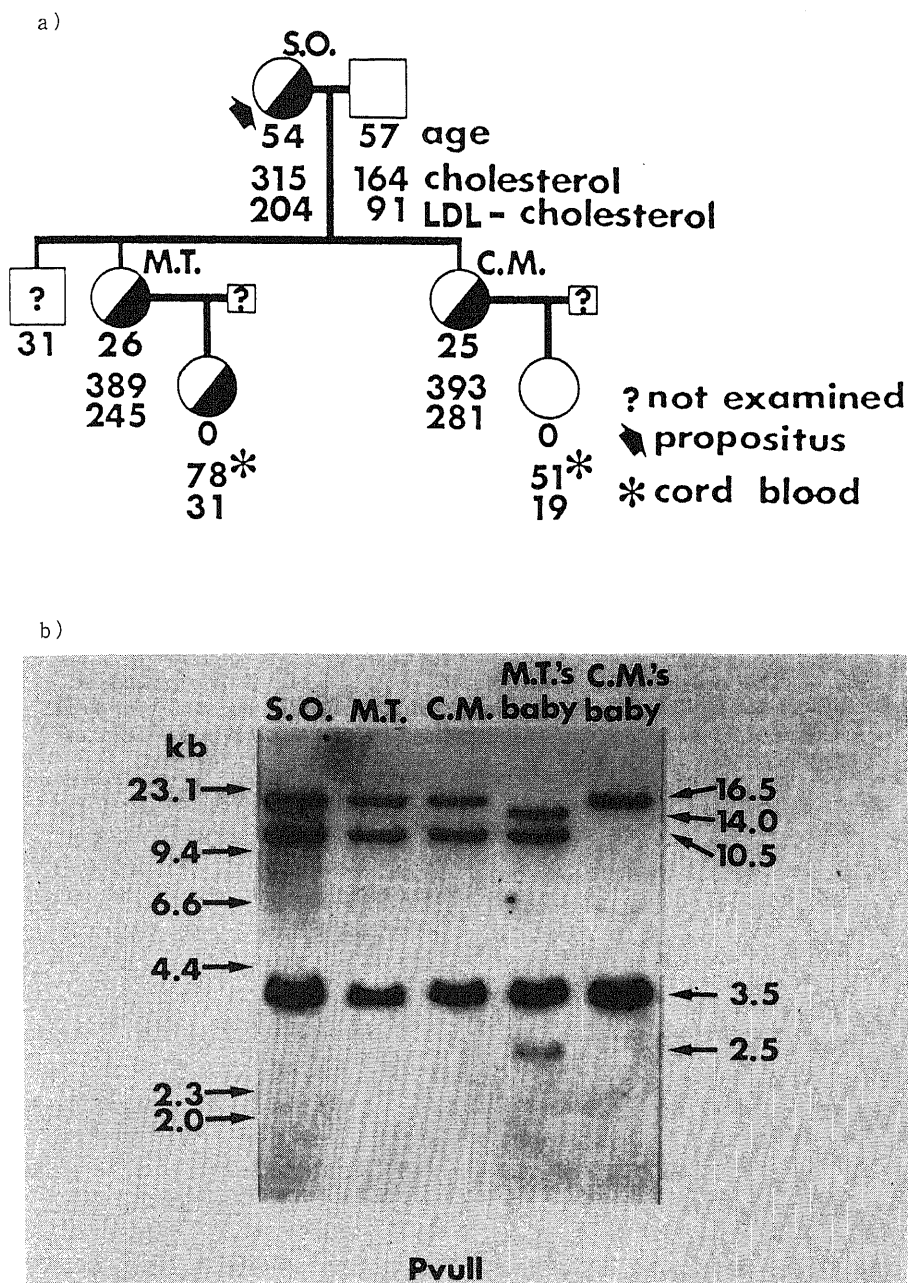


Fig. 8. The analysis of LDL receptor gene in the family of S.O.. The pedigree and the autoradiograph after Pvu II digestion hybridized with pLDLR-2HHI are shown. a) In the pedigree, '◐' indicates the patients with heterozygous familial hypercholesterolemia (FH), and '◻' and '◊' indicate non-FH members. b) All three patients (S.O., M.T. and C.M.) in this family have a common abnormal 10.5 kb fragment derived from mutant allele. M.T.'s baby has three fragments (14.0, 3.5 and 2.5 kb length) derived from allele B³¹¹, and additional 10.5 kb abnormal fragment same as M.T.. C.M.'s baby shows a normal fragment pattern that suggests a genotype AA³¹¹.

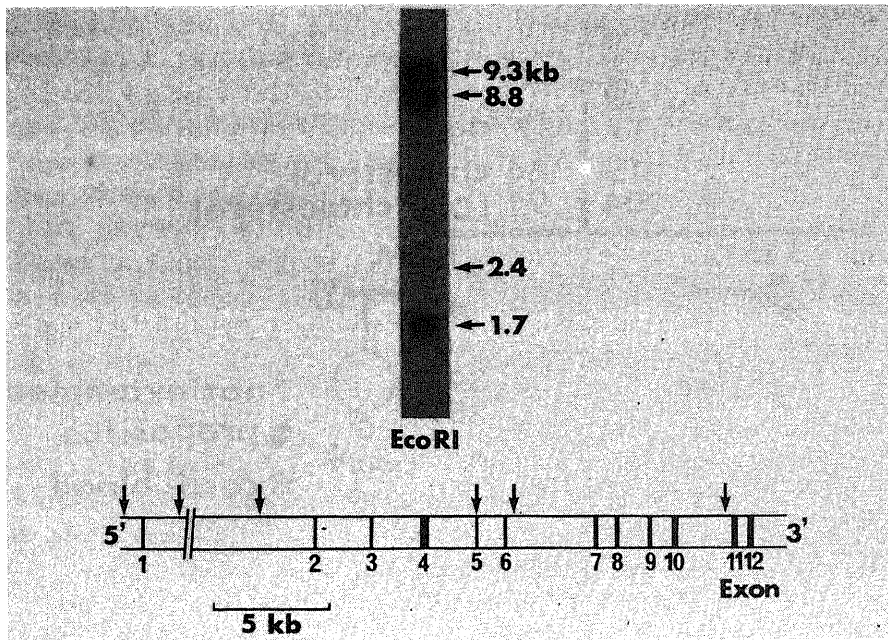


Fig. 9. The analysis of the 5' end of LDL receptor gene. Four fragments (9.5, 8.8, 2.4 and 1.7 kb in length) are visualized after EcoR I digestion hybridized with pLDLR-3XB5. The EcoR I recognition sites are indicated by arrows in the restriction map.

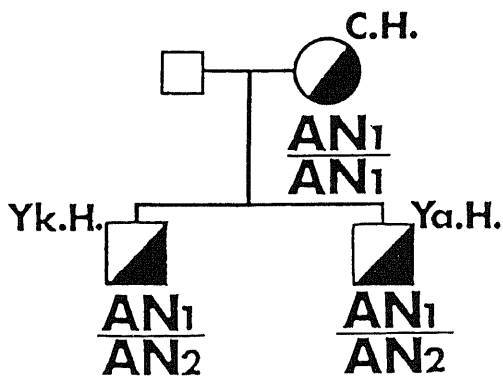


Fig. 10. Restriction site haplotyping in LDL receptor gene based on the RFLPs with Pvu II and Nco I. In the family of C.H., the RFLP with Pvu II (A and B) and Nco I (N₁ and N₂) are analyzed in three patients with heterozygous familial hypercholesterolemia (FH). The allele AN₁ inherited from C.H. to Yk.H. and Ya.H. must cause FH in this family.

らの報告した4例^{[35][36][42][42]}・Hobbsらの報告した1例^[40]・さらにHorsthemkeらの報告した1例^[46]がそれに該当する。今回明らかとなった異常遺伝子でも、図6に示したように、欠損部の3'末端付近(第15イントロン内)にAluシークエンスが存在しており、欠損部の形成にこれに関与した可能性は高いと考えられる。

図7および図8の結果から、K.Y.およびS.O.に見られた異常遺伝子は、両家系内でのFH発症の原因であると考えられた。第3例のH.Y.も含めこれら3家系は、問診上少なくとも過去100年に渡りつながりを持たなかった。しかし共通の遺伝子異常を持つこと、そしてそのような異常遺伝子は頻度が極めて低いこと、さらにはS.O.とK.Y.の出身地は同一地方(富山県南西部の砺波地方)であることから、これら3家系は祖先を共有すると思われた。

LDL受容体遺伝子の3'側を検討した残り37例、および5'側を検討し得た10例には、Southernハイブリダイゼーション上異常が認められなかった。欧米における検討でも、本症における遺伝子異常の多くは本法では検出されないと報告されており^[44]、1ないしは数

塩基の変異がそれらの原因であると思われる。

薬物^{17)~19)}あるいは体外循環を利用した LDL 除去術の開発²⁰⁾は、早期からしかも安全に LDL コレステロールを低下させることを可能とし、FH の早期診断の重要性を高めている。病因論から考えると、培養皮膚線維芽細胞²¹⁾・リンパ球²¹⁾・肝細胞²¹⁾などによる LDL 受容体活性の測定が、本症の診断の決め手であることは言うまでもない。しかしその作業は膨大であり多大な時間も必要とするため、実際には臨床症状からの診断が行われてきた。成人における典型例ではこれらの所見から診断は容易であるが、家族調査の不可能な例や若年例、さらには新生児例などでは困難な場合が少なくない。

本症の出生前診断は、培養羊水細胞の LDL 受容体活性を測定することで可能とされてきた²²⁾。しかし、羊水穿刺に伴う危険や結果判明までの作業の繁雑さなどから、本症患者の全ての妊娠に際しこれを実施することは不可能であった。また本症の出生時診断は、主に臍帯血の血清総コレステロール値・LDL コレステロール値の測定を基になされてきた²³⁾。しかし、この判定は必ずしも信頼のおけるものではないとの指摘も多く、生後 1 年になって初めて確実性を増すと言われている²⁴⁾。

今回明らかになったような異常遺伝子断片を示す症例では、その検出により本症の遺伝子診断が可能である。事実 K.Y. の家系では、高コレステロール血症を示すものの未だ黄色腫などを示さない若年例（第 3 世代の例）についても、遺伝子レベルから確診された。また S.O. の家系では、M.T. の子供が母である M.T. と同じ異常断片（10.5 kb）を示した。つまり M.T. からは異常遺伝子を受け継ぎ、父からは正常遺伝子（allele B（図 2））を受け継いだと考えられた。さらに、臍帯血の血清総コレステロール値・LDL コレステロール値が中等度上昇していたこともそれを裏付けるものと思われた。もっとも、これらの値は、欧米の新生児における診断基準²⁵⁾には満たず、この相違が人種差あるいは食事内容の違いによるのか、また異常遺伝子の特徴を表わすものなのかは判断できなかった。一方 C.M. の子供では、遺伝子分析上異常断片は認められず臍帯血も正脂血症であったことから、本症は否定できた。M.T.・C.M. の次の妊娠はもちろん、他の 2 家系についても、異常断片検出により本症の遺伝子診断を適用できるのは明らかであろう。

先に述べたように、このような異常断片の検出頻度は低く、大多数の症例では正常対照例との間に差は認められなかった。このような場合、複数の RFLP の組み合わせからハプロタイピングを行うことで異常

allele の同定が可能である。図 10 に示した家系では、すべてヘテロ接合体性 FH である C.H.・Yk.H. および Ya.H. に対し Pvu II と Nco I にて分析を行った。その結果、C.H. から Yk.H. および Ya.H. へ受け継がれた AN₁ が異常遺伝子と考えられた。これを利用し、家系内の他の構成員に関する検討、さらにはそれによる遺伝子診断が可能になると思われる。LDL 受容体遺伝子には、Pvu II³⁰⁾³¹⁾・Nco I³²⁾以外に、Ava II³⁴⁾・Pst I³⁵⁾・Stu I³⁶⁾・Msp I³⁷⁾といった制限酵素でも RFLP が報告されており、これらを追加検討することでハプロタイピングはさらに確実なものとなり、診断への応用範囲は広がる³⁸⁾³⁹⁾ものと思われる。

結 論

家族性高コレステロール血症における LDL 受容体遺伝子の異常を、cDNA を使った Southern ハイブリダイゼーションにより検討し、以下の結果を得た。

1. 制限酵素 Pvu II による RFLP を本症患者と正常対照者とで検討したが、この RFLP と本症発症との因果関係は否定的であった。またこの RFLP に関し、その allele の頻度に欧米人との人種差は認められなかった。

2. 40 家系中 3 家系において、約 6 kb の欠損を持つ異常遺伝子を見出した。この欠損は第 15 エクソンを含んだ新しいタイプの異常であった。また家系内においては、臨床的な本症の診断と異常遺伝子との関連に例外はなく、この遺伝子異常が本症を引き起こしていると考えられた。またこれら 3 家系は共通の祖先を持つと考えられた。

3. 残る 37 例には遺伝子上の大きな変化（欠損や挿入）が見られず、本症における遺伝子異常の大部分は、1 ないし数塩基の異常であろうと考えられた。

また家族性高コレステロール血症の遺伝子診断の可能性を検討し、以上の結果を果た。

1. 約 6 kb が欠損した異常遺伝子を持つ家系では、その有無を検討することで遺伝子診断が可能であった。特に 2 例の新生児の臍帯血を分析し、遺伝子レベルからの本症の出生時診断を行い得た。

2. LDL 受容体遺伝子内の RFLP を組み合わせたハプロタイピングにより異常 allele を同定し、これを遺伝子診断に応用できる可能性が示された。

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第二内科第一研究室

の各位に感謝致します。cDNA プローブを提供して頂いたテキサス大学 Russell, Brown, Goldstein の各博士に感謝致します。

尚本研究の一部は、第18回日本動脈硬化学会総会・日本動脈硬化学会昭和61年度冬季大会・第24回日本臨床代謝学会総会シンポジウム・第84回日本内科学会講演会において発表した。

文 献

- 1) Goldstein, J. L. & Brown, M. S.: The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 897-930 (1977).
- 2) 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**, 1-39 (1985).
- 3) Mabuchi, H., Itoh, S., Haba, T., Ueda, K., Ueda, R., Tatami, R., Kametani, T., Koizumi, J., Ohta, M., Miyamoto, S., Takeda, R. & Tekegoshi, T.: Discrimination of familial hypercholesterolemia and secondary hypercholesterolemia by Achilles' tendon thickness. *Atherosclerosis*, **28**, 61-68 (1977).
- 4) 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).
- 5) 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).
- 6) Goldstein, J. L. & Brown, M. S.: Familial hypercholesterolemia. In J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, D. S. Fredrickson, J. L. Goldstein & M. S. Brown (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 5th ed. p.672-712, McGraw-Hill Book Co., New York, 1983.
- 7) Shapiro, L. J., Comings, D. E., Jones, O. W. & Rimoin, D. L.: New frontiers in genetic medicine. *Ann. Int. Med.*, **104**, 527-539 (1986).
- 8) Gusella, J. F.: Recombinant DNA techniques in the diagnosis of inherited disorders. *J. Clin. Invest.*, **77**, 1723-1726 (1986).
- 9) Gusella, J. F.: DNA polymorphism and human disease. *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 831-854 (1986).
- 10) Russell, D. W., Yamamoto, T., Schneider, W. J., Slaughter, C. J., Brown, M. S. & Goldstein, J. L.: cDNA clonig of the bovine low density lipoprotein receptor: Feed back regulation of a receptor mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 7501-7505 (1983).
- 11) Russell, D. W., Schneider, W. J., Yamamoto, T., Luskey, K. L., Brown, M. S. & Goldstein, J. L.: Domain map of the LDL receptor: Sequence homology with the epidermal growth factor precursor. *Cell*, **37**, 577-585 (1984).
- 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 cystein-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell*, **39**, 27-38 (1984).
- 13) 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).
- 14) 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).
- 15) 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. *ibid.*, **228**, 893-895 (1985).
- 16) Goldstein, J. L. & Brown, M. S.: Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *J. Lipid Res.* **25**, 1450-1461 (1984).
- 17) Mabuchi, H., Haba, T., Tatami, R., Miyamoto, S., Sakai, Y., Wakasugi, T., Watanabe, A., Koizumi, J. & Takeda, R.: Effects of an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on serum lipoproteins and ubiquinone-10 levels in patients with familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.*, **305**, 478-482 (1981).

- 18) Mabuchi, H., Sakai, T., Sakai, Y., Yoshimura, A., Watanabe, A., Wakasugi, T., Koizumi, J., Takeda, R.: Reduction of serum cholesterol in heterozygous patients with familial hypercholesterolemia: Additive effects of compaction and cholestyramine. *N. Engl. J. Med.*, **308**, 609-613 (1983).
- 19) Mabuchi, H., Kamon, N., Fujita, H., Michishita, I., Takada, M., Kajinami, K., Itoh, H., Wakasugi, T. & Takeda, R.: Effects of CS-514 on serum lipoprotein lipid and apolipoprotein levels in patients with familial hypercholesterolemia. *Metabolism*, **36**, 475-479 (1987).
- 20) 馬淵 宏, 多々見良三, 上田幸生, 上田良成, 羽場利博, 龜谷富夫, 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).
- 21) 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).
- 22) Southern, E.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
- 23) Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K. & Green, M. R.: Efficient in vitro synthesis of bacteriologically active RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nuc. Acid. Res.* **12**, 7035-7056 (1984).
- 24) Rigby, P. W. J., Diekman, M., Rhodes, C. & Berg, P.: Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.*, **113**, 237-251 (1977).
- 25) Feinberg, A. P. & Vogelstein, B.: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13 (1983).
- 26) 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).
- 27) Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S. G., Richmond, W. & Fu, P. C.: Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, **20**, 470-475 (1974).
- 28) Takayama, M., Ito, S., Nagasaki, T. & Tanimizu, I.: A new enzymatic method for determination of serum cholinecontaining phospholipids. *Clin. Chim. Acta.*, **79**, 93-98 (1977).
- 29) 仁科甫啓: 中性脂肪. *臨床検査*, **22**, 1304-1305 (1978).
- 30) Humphries, S. E., Kessling, A. M., Horsthemke, B., Donald, J. A., Seed, M., Jowett, N., Holm, M., Galton, D. J., Wynn, V. & Williamson, R.: A common DNA polymorphism of the low-density lipoprotein (LDL) receptor gene and its use in diagnosis. *Lancet* **i**, 1003-1005 (1985).
- 31) Hobbs, H. H., Lehrman, M. A., Yamamoto, T. & Russell, D. W.: Polymorphism and evolution of Alu sequences in the human low density lipoprotein receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 7651-7655 (1985).
- 32) Mabuchi, H., Sakai, Y., Watanabe, A., Haba, T., Koizumi, J. & Takeda, R.: Normalization of low-density lipoprotein levels and disappearance of xanthomas during pregnancy in a woman with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Metabolism*, **34**, 309-315 (1985).
- 33) Kotze, M. J., Langenhoven, E., Dietzsch, E. & Retief, A. E.: A RFLP associated with the low-density lipoprotein receptor gene (LDLR). *Nuc. Acids Res.*, **15**, 376 (1987).
- 34) Riss, A., Stocks, J., Sharpe, C. R., Vella, M. A., Shoulders, C. C., Katz, J., Jowett, N. I., Baralle, F. E. & Galton, D. J.: Deoxyribonucleic acid polymorphism in the Apolipoprotein A-1-C-III gene cluster. *J. Clin. Invest.*, **76**, 1090-1095 (1985).
- 35) Lehrman, M. A., Schneider, W. J., Südhof, T. C., Brown, M. S., Goldstein, J. L. & Russell, D. W.: Mutation in LDL receptor: Alu-Alu recombination deletes exons encoding transmembrane and cytoplasmic domains. *Science*, **227**, 140-146 (1985).
- 36) Lehrman, M. A., Russell, D. W., Goldstein, J. L. & Brown, M. S.: Exon-Alu recombination deletes 5 kilobases from the low density lipoprotein receptor gene, producing a null phenotype in familial hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 3679-3683 (1986).
- 37) Lehrman, M. A., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Russell, D. W. & Schneider, W. J.: Internalization-defective LDL receptors produced by genes with nonsense and frameshift mutations that

- truncate the cytoplasmic domain. *Cell*, **41**, 735-743 (1985).
- 38) **Davis, C. G., Lehrman, M. A., Ruseel, D. W., Anderson, R. G., Brown, M. S. & Goldstein, J. L.** : The J. D. mutation in familial hypercholesterolemia : Amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell*, **45**, 15-24 (1986).
- 39) **Yamamoto, T., Bishop, R. W., Brown, M. S., Goldstein, J. L. & Russell, D. W.** : Deletion in cysteine-rich region of LDL receptor impedes transport to cell surface in WHHL rabbit. *Science*, **232**, 1230-1237 (1986).
- 40) **Hobbs, H. H., Brown, M. S., Goldstein, J. L. & Russell, D. W.** : Deletion of exon encoding cysteine-rich repeat of low density lipoprotein receptor alters its binding specificity in a subject with familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.*, **261**, 13114-13120 (1986).
- 41) **Lehrman, M. A., Schneider, W. J., Brown, M. S., Davis, C. G., Elhammer, A., Ruseell, D. W. & Goldstein, J. L.** : The Lebanese allele at the low density lipoprotein receptor locus. *J. Biol. Chem.*, **262**, 401-410 (1987).
- 42) **Lehrman, M. A., Goldstein, J. L., Russell, D. W. & Brown, M. S.** : Duplication of seven exons in LDL receptor gene caused by Alu-Alu recombination in a subject with familial hypercholesterolemia. *Cell*, **48**, 827-835 (1987).
- 43) **Lehrman, M. A., Russell, D. W., Goldstein, J. L. & Brown, M. S.** : Alu-Alu recombination deletes splice acceptor sites and produces secreted low density lipoprotein receptor in a subject with familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.*, **262**, 3354-3361 (1987).
- 44) **Brown, M. S. & Goldstein, J. L.** : A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, **232**, 34-47 (1986).
- 45) **Horsthemke, B., Kessling, A. M., Seed, M., Wynn, V., Williamson, R. & Humphries, S. E.** : Identification of a deletion in the low density lipoprotein receptor gene in a patient with familial hypercholesterolemia. *Hum. Genet.*, **71**, 75-78 (1985).
- 46) **Horsthemke, B., Beisiegel, U., Dunning, A., Havinga, J. R., Williamson, R. & Humphries, S.** : Unequal crossing-over between two alu-repetitive DNA sequences in the low-density-lipoprotein receptor gene. *Eur. J. Biochem.*, **164**, 77-81 (1987).
- 47) **Horsthemke, B., Dunning, A. & Humphries, S.** : Identification of deletion in the human low density lipoprotein receptor gene. *J. Med. Genet.*, **24**, 144-147 (1987).
- 48) **Langlois, S., Kirk, H., Frohlich, J., McLeod, R., Pritchard, H. & Hayden, H. R.** : Familial hypercholesterolemia (FH) caused by a deletion in the 3' end of the LDL-receptor involving the transmembrane domain of the protein [Abstract]. *Am. J. Hum. Genet.*, **39** (suppl), A96 (1986).
- 49) **Daivis, C. G., Elhammer, A., Russell, D. W., Schneider, W. J., Kornfeld, S., Brown, M. S. & Goldstein, J. L.** : Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **261**, 2828-2838 (1986).
- 50) **道下一朗** : ホモ接合体性家族性高コレステロール血症の血漿交換療法に関する研究. *十全医会誌* **96**, 558-574 (1987).
- 51) **Cuthbert, J. A., East, C. A., Bilheimer, D. W. & Lipsky, P. E.** : Detection of familial hypercholesterolemia by assaying functional low-density-lipoprotein receptors in lymphocytes. *N. Engl. J. Med.*, **314**, 879-883 (1986).
- 52) **Brown, M. S., Kovanen, P. T., Goldstein, J. L., Eeckels, R., Vandenberghe, K., Berghe, H. V. D., Fryns, J. P. & Cassiman, J. J.** : Prenatal diagnosis of homozygous familial hypercholesterolemia : Expression of a genetic receptor disease in utero. *Lancet* *i*, 526-529 (1978).
- 53) **Kwiterovich, Jr. P. O., Robert, I. L. & Fredrickson, D. S.** : Neonatal diagnosis of familial type-II hypercholesterolemia. *Lancet* *i*, 118-121 (1973).
- 54) **Hobbs, H. H., Esser, V. & Russell, D. W.** : Ava II polymorphism in the human LDL receptor gene. *Nuc. Acids Res.*, **15**, 379 (1987).
- 55) **Funke, H., Klug, J., Frossard, P., Coleman, R. & Assmann, G.** : Pst I RFLP close to the LDL receptor gene. *Nuc. Acids Res.*, **14**, 7820 (1986).
- 56) **Kotze, M. J., Retief, A. E., Brink, P. A. & Weich, H. F. H.** : A DNA polymorphism in the human low-density lipoprotein receptor gene. *S. Afr. Med. J.*, **70**, 77-79 (1986).
- 57) **Geisel, J., Weisshaar, B., Oette, K., Mechtel, M. & Doerfle, W.** : Double Msp I RFLP in the

human LDL receptor gene. *Nuc. Acids Res.*, **15**, 3943 (1987).

58) **Humphries, S. E.** : Familial hypercholesterolemia as an example of early diagnosis of coronary artery disease risk by DNA techniques. *Br. Heart J.*, **56**, 201-205 (1986).

59) **Leppert, M. F., Hasstedt, S. J., Holm, T., O' Bonnell, P., Wu, L., Ash, O., Willams, R. R. & White, R.** : A DNA probe for the LDL receptor gene is tightly linked to hypercholesterolemia in a pedigree with early coronary disease. *Am. J. Hum. Genet.*, **39**, 300-306 (1986).

Mutation in the Low Density Lipoprotein Receptor Gene in Familial Hypercholesterolemia Kouji Kajinami, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—*J. Juzen Med. Soc.*, **96**, 993—1007(1987)

Key words : Familial Hypercholesterolemia, Low density lipoprotein receptor, Gene mutation, Restriction fragment length polymorphism, Neonatal diagnosis

Abstract

Familial hypercholesterolemia (FH) is produced by mutation in the gene for low density lipoprotein (LDL) receptor, and is characterized by elevated serum LDL cholesterol level, tendon xanthomas and premature coronary atherosclerosis. In the present study, the LDL receptor gene mutations in Japanese FH patients were analyzed with cDNA clone. Genomic DNA samples isolated from peripheral blood were examined by the method of Southern blotting. The same restriction fragment length polymorphism (RFLP) visualized after Pvu II digestion as reported before was found. There were no significant differences of genotype distribution between heterozygous FH patients and control subjects, and of allele frequencies between the present data and those of previous reports. These results indicated that there was no relationship between this RFLP and FH, and no racial difference in this RFLP. Among 40 unrelated patients with heterozygous FH, a 6 kilobase (kb) deleted LDL receptor gene was detected in three cases. This mutant gene was revealed to have eliminated only one exon, exon 15, and the adjacent two introns. This mutant gene was considered as a new variant form based on comparison with those previously reported. In each family of all these three cases, the phenotype of FH and this mutant gene have completely cosegregated. Thus, this deleted LDL receptor gene might have caused FH and these three families might have a common ancestor with FH. In one of these three families, the neonatal diagnosis of FH was done in two babies by checking this deletion in the LDL receptor gene in their cord blood samples. The other 37 patients with heterozygous FH showed no abnormalities on Southern blotting. This indicated that, in most FH patients, the LDL receptor gene mutation must be one or several nucleotides alterations. But, in those cases, restriction site haplotyping combined with several RFLPs in the LDL receptor gene is useful for the detection of the abnormal allele leading to the diagnosis of FH at DNA level.