

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 16日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591160

研究課題名（和文） 家族性高コレステロール血症の原因遺伝子別系統的病態解析

研究課題名（英文） Systematic Analysis of Pathophysiology of Familial Hypercholesterolemia Due to Different Causal Gene Mutations

研究代表者

川尻 剛照（KAWASHIRI MASAOKI）

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：90345637

研究成果の概要（和文）：

常染色体劣性高コレステロール血症のLDL異化率は正常者に比し75%低下し、VLDLの直接異化率は著明に亢進していた。スタチンによりLDL異化率は正常化し、VLDL直接異化率は上昇した。PCSK9遺伝子異常ホモ接合体のLDL異化率は正常者に比し52%低下し、VLDL合成率、VLDL直接異化率はいずれも亢進していた。スタチンによりLDL異化率は正常化したが、VLDL合成率、直接異化率は不変であった。

研究成果の概要（英文）：

The fractional catabolic rate (FCR) of low-density lipoprotein (LDL) apolipoprotein B (apoB) in a patient with autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) was 75% smaller, whereas direct removal of very-LDL apoB was dramatically greater compared with those of normal control subjects. Statin therapy normalized FCR of LDL apoB and increased direct removal of very-LDL in ARH patient. On the other hand, the FCR of patients with homozygous proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) gene mutation was 52% smaller than that of normal control subjects and normalized by statin therapy. Whereas, both production rate and direct removal of very-LDL was increased compared with those of normal control subjects, which were not changed by statin therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：脂質代謝

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：脂質代謝異常、家族性高コレステロール血症、安定同位体

## 1. 研究開始当初の背景

家族性高コレステロール血症（familial hypercholesterolemia: FH）は、低比重リポ蛋白（low-density lipoprotein: LDL）受容体（LDL receptor: LDLR）遺伝子異常により生じる常染色体優性遺伝疾患である。近年、

LDLRに関連した分子の遺伝子異常により、臨床的にFH類似の臨床像を呈することが明確とされた。

LDLRを細胞膜の内側から裏打ちする蛋白LDLRAP1（LDLR adaptor protein1）の異常症は、常染色体劣性高コレステロール血

症 (autosomal recessive hypercholesterolemia: ARH) として知られているが (Garcia CK et al. Science 2001;292:1394-8.)、症例の報告は世界的に 70 例程度、本邦からわれわれの症例を含み 2 家系のみである。臨床像はホモ FH に類似するが、LDLR 遺伝子異常によるホモ FH (古典的 FH) と異なり、スタチン製剤をはじめとする脂質低下剤に良好に反応した。

PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin9) は、何等かのメカニズムで肝細胞内 LDLR 分解に関係し、肝細胞表面の LDLR 数を調整する機能を有する。近年、その機能亢進型変異が FH の原因となることが報告された (Abifadel M et al. Nature Genet. 2003;34:154-6.)。われわれは PCSK9 遺伝子の機能亢進型変異 E32K を見出した。PCSK9 遺伝子 E32K 変異のホモ接合体を 2 例経験したが、無治療時 TC 値、アキレス腱肥厚の程度はヘテロ FH と同程度であった。スタチン製剤をはじめとする脂質低下剤に良好に反応した。

LDLRAP1 (ARH) や PCSK9 遺伝子異常症の臨床像は LDL 受容体遺伝子異常症 (古典的 FH) と酷似するが、特にスタチン製剤に対する反応性は大きく異なる。したがって、これら LDLR 関連分子の異常による脂質代謝のメカニズムは、LDLR 遺伝子異常症と異なる可能性があり、その解明は新規コレステロール低下剤の開発に貢献する可能性が高い。

## 2. 研究の目的

LDLR に関連し、ともに FH の原因分子である LDLRAP1 (ARH) や PCSK9 の遺伝子異常症の臨床像を、LDLR 遺伝子異常症 (古典的 FH) との比較で明確にし、安定同位体を用いた *in vivo* 代謝研究により LDLRAP1 (ARH) および PCSK9 遺伝子異常症の脂質代謝異常のメカニズムおよびスタチン製剤への反応性の相違を明確とすること。

また、血漿 PCSK9 値測定系を確立し、血中 PCSK9 値と FH の臨床像の関連・一般人における脂質像・動脈硬化症との関連を明確とすること。

## 3. 研究の方法

[LDLRAP1、PCSK9 遺伝子異常症の臨床像]

ARH (LDLRAP1 IncC599 遺伝子変異症ホモ接合体) 発端者と家系内ヘテロ接合体、および PCSK9 E32K 遺伝子変異症ホモ接合体の空腹時脂質像とアキレス腱厚を測定し、LDL 受容体変異症 (古典的 FH) と比較した。

[安定同位体を用いた *in vivo* 代謝研究]

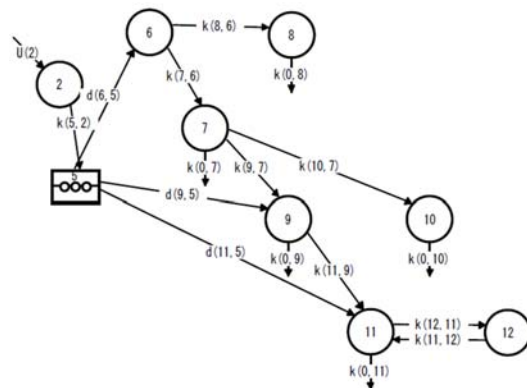
ARH 発端者 1 例と PCSK9 E32K 遺伝子変異症ホモ接合体 2 例、および正脂血症者 7 例を対象に安定同位体を用いたアポ B 代謝研

究を行った。

すべての脂質低下剤を 4 週間以上中止し、12 時間以上の早朝空腹状態で、 $^2\text{H}_3$ -ロイシン (アポ蛋白代謝実験) を静注し、48 時間後まで経時的に頻回 (前、5、15、30 分、1、1.5、2、2.5、3、4、5、6、8、10、12、33、48 時間) の採血を行った。超遠心法により

VLDL、intermediate-density lipoprotein: IDL、LDL、high-density lipoprotein: HDL を分画し、さらにイソプロパノール沈殿法によってアポ B を分離した。アポ A は電気泳動法にて分離し、加水分解 (6N 塩酸、11°C、24 時間)、アミノ酸の修飾後、ガスクロマトグラム質量分析計 (H5973、ヨコガワアナリティカルシステムズ: GM-MS) に注入し、トレーサー濃度 (tracer/tracee ratio: T/T 比) を測定した。

コンピューターソフト SAAMII を用いたモデリングに T/T 比を当てはめ、代謝パラメーター (VLDL、IDL、LDL 中アポ B、VLDL-TG の異化速度、合成速度) を算出した (下図)。求められたパラメーターを FH の原因遺伝子 (LDLRAP1、PCSK9) 別に検討し、正常者と比較することにより、これらの分枝のコレステロール代謝へ果たす役割を明確とした。



同様に ARH 発端者 1 例と PCSK9 E32K 遺伝子変異症ホモ接合体 1 例に対し、atorvastatin 20mg を 4 週間以上内服下に同様の代謝研究を行い、スタチン製剤による肝細胞内コレステロール低下と LDL 受容体発現の亢進がコレステロール代謝に及ぼす影響を LDLRAP1 と PCSK9 遺伝子別に明確とした。

[PCSK9 値と FH の臨床像との関連]

当初、血漿中 PCSK9 値測定系を開発する予定であったが、研究の進行が遅れた。幸い、同時期に PCSK9 測定キット (Circulex, Nagano) が市販されたため、同キットを用いて血漿 PCSK9 値を測定した。

LDLR 遺伝子異常症 (古典的 FH) と PCSK9 E32K 遺伝子異常症ヘテロおよびホモ接合体の早朝空腹時検体を用い血漿 PCSK9 値を測定し、血清 LDL コレステロー

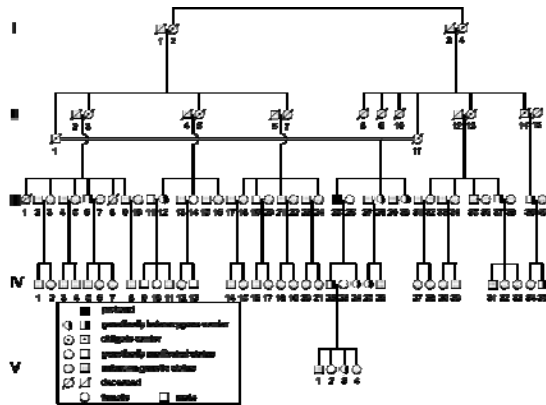
ル値との相関を求めた。

#### 4. 研究成果

[LDLRAP1、PCSK9 遺伝子異常症の臨床像]

ARH 発端者の無治療時 LDL-C 値は 334mg/dL であったが、atorvastatin 20mg の投与により 163mg/dL まで低下した。アキレス腱黄色腫は 26mm と著明に肥厚し、手背伸筋腱にも著明な黄色腫を認めた。

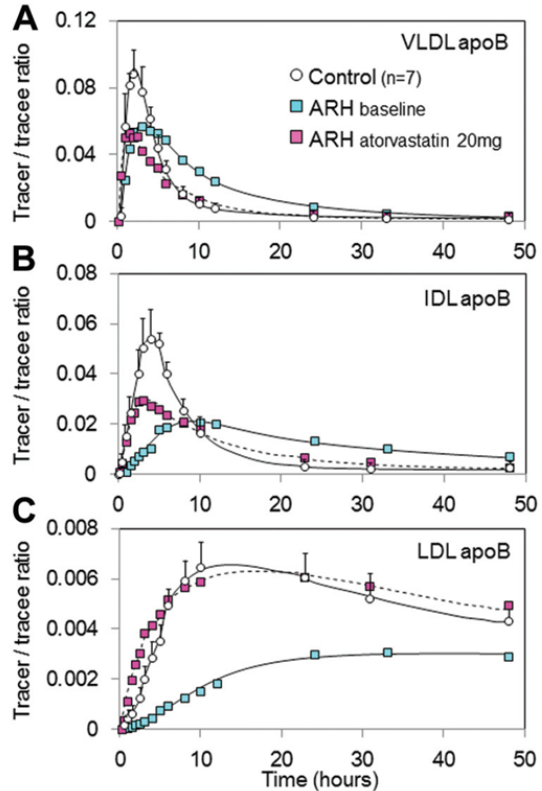
ARH 発端者の家系 19 例を検討し、LDLRAP1 IncC599 遺伝子変異症ヘテロ接合体を 11 例、正常者を 8 例同定した(下図)。ヘテロ接合体および正常者の平均 LDL-C 値は  $150 \pm 34$ 、 $118 \pm 25$ mg/dL であり、正常者に比しヘテロ接合体で有意に ( $p < 0.05$ ) 高値であった。9mm 以上のアキレス腱肥厚を伴う症例は認めなかった。LDL 受容体変異症(古典的 FH: 平均 LDL-C 値 約 250mg/dL)と比較明らかに軽症であるが、「劣性」疾患と考えられていた本症であるが、軽症高コレステロール血症との関連を明確とした (Tada H, Kawashiri M, et al. Circ Cardiovasc Genet, 5(2012):35-41.)。



PCSK9 E32K 変異ホモ接合体の無治療時 LDL-C 値は 339、246mg/dL であり、スタチンを含むコレステロール低下剤に良好に反応した。アキレス腱厚はともに 11mm と LDL 受容体変異症(古典的 FH)と同程度であった。一般人を対象に PCSK9 E32K 変異をスクリーニングしたところ、同変異を 351 例中 6 例 (1.71%) に認め、いずれの症例も LDL-C 値による 5 分位の上位 2 分位 (LDL-C 値: 122.6-138.9、139.0-222.4mg/dL) に属していた。また、臨床的に FH と診断された症例の 6.42% に同遺伝子変異を認めた。このことから PCSK9 E32K 変異は一般人にも高頻度に認めるが、必ずしも全例が FH の臨床像を呈するわけではなく、何等かの追加の遺伝・環境因子が重なることで FH の臨床像を呈する可能性が示唆された (Noguchi T, Katsuda S, Kawashiri M, et al. Atherosclerosis, 210(2010):166-72.)。

[安定同位体を用いた in vivo 代謝研究]

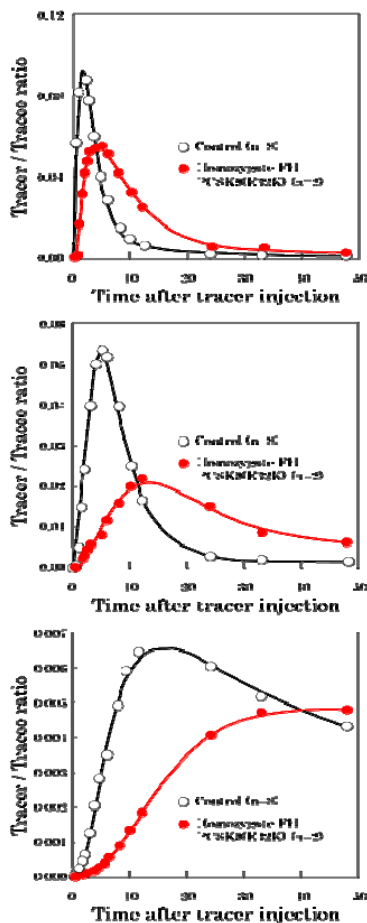
すべての脂質低下剤を 3 ヶ月間中止の後、ARH 発端者と正常者 (7 例) に対し安定同位体を用いた in vivo 代謝研究を行った。VLDL、IDL、LDL 中アポ B の tracer/tracee 比を下図に示す。ARH 発端者と正常者の VLDL、IDL、LDL アポ B 異化率はそれぞれ  $3.153$  vs.  $8.408 \pm 2.697$ 、 $1.414$  vs.  $8.326 \pm 3.467$ 、 $0.109$  vs.  $0.450 \pm 0.122$  pools/day であり、いずれも



ARH 発端者で遅延していた。一方、合成率はそれぞれ  $9.180$  vs.  $13.172 \pm 4.664$ 、 $9.560$  vs.  $10.562 \pm 5.194$ 、 $6.980$  vs.  $13.947 \pm 3.636$ mg/kg/day であり、正常者と比し  $\pm 2SD$  内にあった。従って、ARH の脂質異常は第一義的にアポ B 含有リポ蛋白の異化異常であることが明確となった。Atorvastatin 20mg の投与により LDL アポ B 異化率は  $0.464$  pools/day とほぼ正常化した。一方、正常者でほとんど認められない VLDL レムナントの direct removal は著明に亢進しており ( $47.5$  vs.  $2 \pm 2\%$ )、atorvastatin 投与によりさらに  $71.9\%$  と亢進した (Tada H, Kawashiri M, et al. Circ Cardiovasc Genet, 5(2012):35-41.)。

同様に、すべての脂質低下剤を 1 ヶ月以上中止の後、PCSK9 E32K 変異ホモ接合体 (2 例) に対し安定同位体を用いた in vivo 代謝研究を行った。VLDL、IDL、LDL 中アポ B の tracer/tracee 比を下図に示す。PCSK9 E32K 変異ホモ接合体 (2 人) と正常者 (8 人) の VLDL、IDL、LDL アポ B 異化率はそれぞれ  $3.736 \pm 0.695$  vs.  $8.552 \pm 2.530$ 、

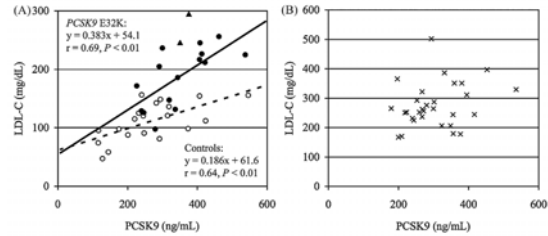
4.289±1.830 vs. 8.847±3.539、0.218±0.015 vs. 0.455±0.114 pools/day であり、いずれも PCSK9 E32K 変異ホモ接合体で遅延していた。一方、合成率はそれぞれ 29.630±1.020 vs. 12.677±4.539、19.300±1.734 vs. 10.338±4.850、13.744±0.824 vs. 13.905±3.368mg/kg/day であり、VLDL および IDL アポ B の合成は亢進していた。従って、PCSK9 E32K 変異の脂質異常は、アポ B 含有リポ蛋白の異化異常と VLDL、IDL 合成亢進によることが明確となった。PCSK9 E32K 変異ホモ接合体のうち 1 例に対し atorvastatin20mg の投与を行った。LDL アポ B 異化率は 0.232→0.450pools/day とほぼ正常化した。一方、正常者でほとんど認められない VLDL レムナントの direct removal は著明に亢進していたが、atorvastatin 投与により変化は認められなかった。



[PCSK9 値と FH の臨床像との関連]

PCSK9 E32K 遺伝子変異ヘテロ接合体の血漿 PCSK9 値は正常対照群と比較し有意に高値であった (349±90 vs. 266±112ng/mL)。PCSK9 E32K 遺伝子変異ヘテロ接合体と正常者のいずれにおいても、血漿 PCSK9 値と血清 LDL-C 値には有意な正相関を認めた (r=0.69 p<0.01、r=0.64 p<0.01)。一方、LDLR 変異を有する FH 患者の血漿 PCSK9 値は 304±83ng/mL とやや高値であったが、

LDL-C 値と有意な相関を認めなかった。PCSK9 E32K 変異のホモ接合体の PCSK9 値は 363ng/mL とヘテロ接合体に近い値を示したが、PCSK9 値と LDL-C 値の回帰直線の角度はより急峻であった (Noguchi T, Katsuda S, Kawashiri M, et al. *Atherosclerosis*, 210(2010):166-72.)。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 34 件)

- ① Tada H, Kawashiri MA, Ikewaki K, Terao Y, Noguchi T, Nakanishi C, Tsuchida M, Takata M, Miwa K, Konno T, Hayashi K, Nohara A, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M. Altered metabolism of low-density lipoprotein and very-low-density lipoprotein remnant in autosomal recessive hypercholesterolemia: results from stable isotope kinetic study in vivo. *Circ Cardiovasc Genet*, 5(2012):35-41. 査読有 DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.111.960948
- ② Ohtani R, Inazu A, Noji Y, Wakasugi T, Miwa K, Tada H, Kawashiri MA, Noguchi T, Nohara A, Kobayashi J, Koizumi J, Yamagishi M, Mabuchi H. Novel mutations of cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene in Japanese hyperalphalipoproteinemic subjects. *Clin Chim Acta*, 413(2012):537-43. 査読有 DOI:10.1016/j.cca.2011.11.010
- ③ Kawashiri MA, Nohara A, Noguchi T, Tada H, Nakanishi C, Mori M, Konno T, Hayashi K, Fujino N, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M. Efficacy and safety of coadministration of rosuvastatin, ezetimibe, and colestimide in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*, 109(2012):364-9. 査読有 DOI:10.1016/j.amjcard.2011.09.019



- ④ Tada H, Kawashiri MA, Ohtani R, Noguchi T, Nakanishi C, Konno T, Hayashi K, Nohara A, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M. A novel type of familial hypercholesterolemia: double heterozygous mutations in LDL receptor and LDL receptor adaptor protein 1 gene. *Atherosclerosis*, 219(2011):663-6. 査読有 DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2011.08.004
- ⑤ Kawashiri MA, Kobayashi J, Nohara A, Noguchi T, Tada H, Nakanishi C, Inazu A, Mabuchi H, Yamagishi M. Impact of bezafibrate and atorvastatin on lipoprotein subclass in patients with type III hyperlipoproteinemia: result from a crossover study. *Clin Chim Acta*, 412(2011):1068-75. 査読有 DOI:10.1016/j.cca.2011.02.026
- ⑥ Mabuchi H, Nohara A, Noguchi T, Kobayashi J, Kawashiri MA, Tada H, Nakanishi C, Mori M, Yamagishi M, Inazu A, Koizumi J; Hokuriku FH Study Group. Molecular genetic epidemiology of homozygous familial hypercholesterolemia in the Hokuriku district of Japan. *Atherosclerosis*, 214(2011):404-7. 査読有 DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2010.11.005
- ⑦ Nozue T, Higashikata T, Inazu A, Kawashiri MA, Nohara A, Kobayashi J, Koizumi J, Yamagishi M, Mabuchi H. Identification of a novel missense mutation in the sterol 27-hydroxylase gene in two Japanese patients with cerebrotendinous xanthomatosis. *Intern Med*, 49(2010):1127-31. 査読有 DOI:10.2169/internalmedicine.49.3277
- ⑧ Noguchi T, Katsuda S, Kawashiri MA, Tada H, Nohara A, Inazu A, Yamagishi M, Kobayashi J, Mabuchi H. The E32K variant of PCSK9 exacerbates the phenotype of familial hypercholesterolemia by increasing PCSK9 function and concentration in the circulation. *Atherosclerosis*, 210(2010):166-72. 査読有 DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2009.11.018
- ⑨ Miwa K, Inazu A, Kawashiri MA, Nohara A, Higashikata T, Kobayashi J, Koizumi J, Nakajima K, Nakano T, Niimi M, Mabuchi H, Yamagishi M. Cholesterol efflux from J774 macrophages and Fu5AH hepatoma cells to serum is preserved in CETP-deficient patients. *Clin Chim Acta*, 402(2009):19-24. 査読有 DOI:10.1016/j.cca.2008.12.012
- ⑩ Miyazaki O, Fukamachi I, Mori A, Hashimoto H, Kawashiri MA, Nohara A, Noguchi T, Inazu A, Yamagishi M, Mabuchi H, Kobayashi J. Formation of prebeta1-HDL during lipolysis of triglyceride-rich lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, 379(2009):55-9. 査読有 DOI:10.1016/j.bbrc.2008.11.146
- [学会発表] (計 11 件)
- ① Masaaki Kawashiri, Katsunori Ikewaki, Tohru Noguchi, et al. Impact of impaired LDL catabolism and increased VLDL and VLDL remnant production on hypercholesterolemia in homozygous PCSK9 mutation: Evidence from a kinetic study with stable isotope, 84<sup>th</sup> American Heart Association 2011 Scientific Sessions, 2011.11.12-16, Orange County Convention Center, Orlando, USA
- ② 川尻剛照, パネルディスカッション 多剤併用による積極的脂質管理と新規脂質低下剤の可能性, 第 59 回日本心臓病学会学術集会, 2011 年 9 月 23-25 日, 神戸国際会議場 (神戸、兵庫県)
- ③ 川尻剛照, 野口徹ほか, Impact of elevated PCSK9 levels on regulation of LDL-cholesterol after statin treatment: Study with different types of lipid lowering drugs, 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会, 2011 年 8 月 3-4 日, パシフィコ横浜 (横浜、神奈川県)
- ④ 川尻剛照, 池脇克則, 野口徹ほか, Impaired LDL catabolism and increased VLDL and VLDL remnant production in homozygous familial hypercholesterolemia with PCSK9 gene mutation, 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会, 2011 年 8 月 3-4 日, パシフィコ横浜 (横浜、神奈川県)
- ⑤ 川尻剛照, 野口徹ほか, Elevation of PCSK9 levels after statin therapy: study with different types of lipid lowering drugs, 第 43 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2011 年 7 月 15-16 日, ロイトン札幌 (札幌、北海道)
- ⑥ Masaaki Kawashiri, Katsunori Ikewaki, Tohru Noguchi, et al. Impact of elevated PCSK9 levels on regulation of LDL-cholesterol after statin

treatment: Study with different types of lipid lowering drugs, 60<sup>th</sup> Annual Scientific Session of American College of Cardiology, 2011.4.3-5, Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, (USA)

- ⑦ 川尻剛照, ワークショップ FH ヘテロ接合体と LDL アフェレーシス, 第 31 回日本アフェレーシス学会学術大会, 2010 年 11 月 4-5 日, ディズニーアンバサダーホテル (幕張、千葉県)
- ⑧ 川尻剛照, The effects of combination therapy with permitted maximum doses of rosuvastatin, ezetimibe and colestimide in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia, 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会, 2010 年 7 月 15-16 日, 長良川国際会議場 (岐阜、岐阜県)
- ⑨ 川尻剛照, シンポジウム Impact of the LDL-receptor-related molecules on achievement of optimal LDL cholesterol level: evidence from newly identified gene mutations, 第 74 回日本循環器学会総会・学術集会, 2010 年 3 月 5-7 日, 国立京都国際会館 (京都、京都府)
- ⑩ Masaaki Kawashiri, Enhanced effect of bezafibrate on HDL subfraction in patients with dysbetalipoproteinemia: Results from a crossover study with atorvastatin, 2009 International Symposium on Atherosclerosis, 2009. 6.14-18, Hynes Convention Center, Boston, USA
- ⑪ Masaaki Kawashiri, Impact of co-administration of atorvastatin and bezafibrate on the lipoprotein subclass: Comparison between apoE2/2 and E3/3, 17<sup>th</sup> Asian Pacific Congress of Cardiology, 2009.5.20-23, International Conference Center (Kyoto)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川尻 剛照 (KAWASHIRI MASA AKI)  
金沢大学・附属病院・講師  
研究者番号：90345637

### (2) 研究分担者

野口 徹 (NOGUCHI TOHRU)  
金沢大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：40456421

### (3) 連携研究者

池脇 克則 (IKEWAKI KATSUNORI)  
防衛医科大学校・老年内科・教授