

- 査研究(第二報)-糖尿病患者からみた現状について-. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 2010.5.29(岡山)
39. 菅野咲子, 佐藤舞菜見, 藤井恵理, 横田友紀, 石村郁恵, 曾根博仁, 中村公英, 本庄潤, 山田大志郎, 横山宏樹. ピオグリタゾンの肝機能検査値への影響. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 2010.5.28(岡山)
40. 横田友紀, 宮腰千晴, 菅野咲子, 佐藤舞菜見, 石村郁恵, 山下りさ, 高橋直穂, 本庄潤, 山田大志郎, 中村公英, 曾根博仁, 横山宏樹. 血管保護に重点をおいたチーム医療による糖尿病の集約的治療:達成率, 施行率の追跡調査. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 2010.5.28(岡山)
41. 菅原歩美, 酒井百合子, 本橋しのぶ, 佐藤睦美, 曾根博仁, 川井紘一. 女性2型糖尿病患者における食事指導後の摂取/指示カロリー比と5年後の血糖コントロール状況. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 2010.5.28(岡山)
42. 畑中麻梨恵, 山下りさ, 石村郁恵, 横田友紀, 菅野咲子, 佐藤舞菜見, 山田大志郎, 本庄潤, 曾根博仁, 横山宏樹. 2型糖尿病の肥満への減量介入. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 2010.5.28(岡山)
43. 石村郁恵, 山下りさ, 横田友紀, 菅野咲子, 佐藤舞菜見, 高橋直穂, 本庄潤, 山田大志郎, 曾根博仁, 中村公英, 横山宏樹. インスリン導入のタイミングと方法に関する観察研究. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 2010.5.28(岡山)
44. 斎藤あき, 川井紘一, 柳澤守文, 栗林伸一, 横山宏樹, 杉本英克, 大石まり子, 和田崇子, 屋宜宣治, 宮澤一裕, 岩崎皓一, 新井桂子, 児玉暁, 曾根博仁. 2型糖尿病患者における睡眠時間と糖尿病コントロールとの関連. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 2010.5.27(岡山)
45. 藤井恵理, 佐藤舞菜見, 辻景子, 田川聖子, 宮腰千晴, 高橋直穂, 山田大志郎, 曾根博仁, 本庄潤, 中村公英, 横山宏樹. 2型糖尿病に認められる脂肪感改善率と奏功因子の探索. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 2010.5.27(岡山)
46. 平安座依子, 原茂子, 荒瀬康司, 斎藤和美, 戸塚久美子, 辻裕之, 児玉暁, 謝勲東, 山田信博, 小坂樹徳, 曾根博仁. 低カリウム血症は2型糖尿病発症の新たな独立した危険因子である: Toranomon Hospital Health Management Center Study (TOPICS). 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 2010.5.27(岡山)
47. 児玉暁, 斎藤和美, 小林和人, 矢藤繁, 高橋昭光, 鈴木浩明, 島野仁, 山田信博, 曾根博仁. 血中尿酸値と2型糖尿病発症の関連についてのメタ解析. 第107回日本内科学会講演会 2010.4.10(東京)

表 2型糖尿病患者における各種脂質パラメータの1標準偏差(SD)上昇あたりの冠動脈疾患発症ハザード比

	Men		Women	
	HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
Total cholesterol	1.54 (1.22,1.94)	0.000	1.58 (1.21,2.06)	0.001
LDL cholesterol	1.59 (1.28,1.98)	<.0001	1.41 (1.06,1.86)	0.018
HDL cholesterol	1.45 (1.07,1.95)	0.015	1.05 (0.75,1.48)	0.764
Triglycerides (log transformed)	1.29 (1.01,1.66)	0.040	1.62 (1.18,2.25)	0.003
Non-HDLC	1.73 (1.38,2.15)	<.0001	1.60 (1.21,2.11)	0.001
TC/HDLC ratio	1.59 (1.32,1.92)	<.0001	1.47 (1.11,1.94)	0.007
LDLC/HDLC ratio	1.52 (1.29,1.79)	<.0001	1.44 (1.09,1.91)	0.010
TG/HDLC ratio	1.26 (1.04,1.51)	0.016	1.25 (0.97,1.59)	0.081

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

2型糖尿病における冠動脈不安定プラークと脂質パラメーターとの関連

分担研究者 鈴木浩明（筑波大学大学院人間総合科学研究科 准教授）

研究協力者 藤原和哉、佐藤明、曾根博仁（筑波大学大学院人間総合科学研究科）

研究要旨

冠動脈 CT を用いて、急性冠症候群の発症と密接に関連している冠動脈不安定プラークと脂質値との関連について検討した。冠動脈 CT を施行した 72 名の冠動脈疾患の既往のない 2 型糖尿病患者を対象にした。冠動脈内腔の 50%以上の狭窄を冠動脈病変、冠動脈病変を形成するプラークの CT 値が 50HU 未満もしくは positive vessel remodeling を不安定プラークと定義した。

高血圧、糖尿病罹病期間、頸動脈超音波における max IMT が冠動脈病変の独立した予測因子であった。一方、冠動脈不安定プラークの独立した予測因子は、LDL-C/HDL-C (L/H) 比と頸動脈の不安定プラークであった。総コレステロール、LDL-C、non-HDL-C、トリグリセリド、HDL-C、L/H 比と冠動脈不安定プラークの個数との関連を解析すると、LDL-C、non-HDL-C、L/H 比と冠動脈不安定プラークの個数に有意な関連が認められた。これらの結果より、冠動脈プラークの不安定化には、脂質異常症が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

糖尿病患者では冠動脈疾患発症のリスクが高い。負荷心筋 SPECT での検討では、糖尿病では無症候性の冠動脈疾患の頻度が高いことや、負荷心筋 SPECT の異常が冠危険因子の合併と独立していることが報告されている。一方、急性心筋梗塞や不安定狭心症などの急性冠症候群 (ACS) の 3 分の 2 はプラークの破綻が原因とされるが、破綻したプラークは有意狭窄を有さないものも多い。また、ACS の原因となるプラークは、脂質に富んだコアを持ち、線維性皮膜が薄く、血管の positive remodeling が認められる。

近年、非侵襲的な冠動脈病変の診断として CT coronary angiography (CTCA) が広く使用されてきている。しかし、CTCA は被曝量が多く検

査の適応が問題となる。そこで冠動脈病変、中でも冠動脈不安定プラークを有する患者を選択的に推定する方法を確立することが望まれる。しかし、CTCA を使用した冠動脈不安定プラークの有無と日常臨床で利用される検査指標との関連については明らかにされていない。2 型糖尿病患者における冠動脈不安定プラークを有する患者の特徴を明らかにすることにより、急性冠症候群のリスクの高い冠動脈病変の早期発見、早期介入と予後の改善につながる可能性がある。

2 型糖尿病患者における CTCA による冠動脈狭窄および冠動脈不安定プラークの診断に関する臨床指標を明らかにし、急性冠症候群の予防に役立てることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

2009 年 4 月から 2010 年 11 月までに筑波大学

附属病院内分泌代謝・糖尿病内科に入院した 2 型糖尿病患者 355 症例のうち、IMT (Intima-Media Thickness) 肥厚例、心電図異常例、運動負荷心電図にて陽性所見から無症候性心筋虚血が疑われ、CTCA を施行した 72 症例について検討を行った。CTCA において 50%以上の狭窄病変を冠動脈病変、そのうち CT 値 <50 HU、または positive vessel remodeling を冠動脈不安定プラークとした。また頸動脈超音波検査において低輝度プラークを頸動脈不安定プラークとした。臨床検査指標と冠動脈病変または冠動脈不安定プラークの有無で比較し、有意であった指標を従属変数、冠動脈病変もしくは冠動脈不安定プラークを独立変数としたロジスティック回帰分析で解析した。また、不安定プラークの個数と脂質値の関連について、共分散分析で検討した。

C. 研究結果

表 1 に患者背景を示す。ロジスティック回帰分析の結果、糖尿病罹病期間と max IMT、高血圧が冠動脈病変の、また L/H 比と頸動脈不安定プラークが冠動脈不安定プラークの独立した予測因子であった。max IMT ≥ 1.7 mm をカットオフ値とすると、冠動脈病変検出の感度、特異度、陽性的中率(PPV)、陰性的中率(NPV)はそれぞれ、88.4%、58.6%、76.0%、77.3%であり、2.0-5.0 の範囲で L/H 比を組み合わせても感度、特異度は上昇しなかった。冠動脈不安定プラークに関して、頸動脈不安定プラーク陽性では、感度 66.7%、特異度 66.7%、PPV 45.2%、NPV 82.9%であったが、頸動脈不安定プラーク陽性または L/H 比 ≥ 4.0 とすると、冠動脈不安定プラークの感度、特異度、PPV、NPV はそれぞれ、81.0%、62.7%、47.2%、88.9%と向上した。

冠動脈不安定プラークの個数と脂質値との関連について検討すると、LDL-C 値、non-HDL-C 値、L/H 比と不安定プラークの個数に有意な関連が認められた (表 2)。

D. 考察

2 型糖尿病において、頸動脈病変の性状が冠動脈病変の性状を良く反映することが示された。また、頸動脈不安定プラークとともに L/H 比が独立した冠動脈不安定プラークの独立した予測因子であった。冠動脈不安定プラークを有する群は、有さない群に較べては、LDL-C、non-HDL-C、L/H 比が有意に高値であり、冠動脈不安定プラークの発症に高 LDL-C 血症が関与していることが示唆された。HDL-C については冠動脈不安定プラークの有無で有意差は認められなかったが、LDL-C よりも L/H 比の方が冠動脈不安定プラークとより関連していたことから、HDL も LDL ほどではないが冠動脈病変の不安定化に関与していることが示唆された。

また、冠動脈病変や冠動脈不安定プラークの有無を頸動脈エコー所見と血清脂質値からある程度予測可能であることが明らかとなり、2 型糖尿病のなかでも、簡便に、より冠動脈疾患のリスクが高い患者に対して、早期により厳格な介入を行うことが可能になると考えられる。

E. 結論

冠動脈病変の不安定化には、血清脂質異常が関与している可能性が示唆された。

F. 健康被害情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto T, Watanabe K, Inoue N, Nakagawa Y, Ishigaki N, Matsuzaka T, Takeuchi Y, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Suzuki H, Yahagi N, Gotoda T, Yamada N, Shimano H. Protein kinase C β mediates hepatic induction of sterol-regulatory element binding protein-1c by insulin. J Lipid Res 51:1859-70, 2010

2. Danno H, Ishii KA, Nakagawa Y, Mikami M, Yamamoto T, Yabe S, Furusawa M, Kumadaki S, Watanabe K, Shimizu H, Matsuzaka T, Kobayashi K, Takahashi A, Yatoh S, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. The liver-enriched transcription factor CREBH is nutritionally regulated and activated by fatty acids and PPARalpha. *Biochem Biophys Res Commun* 391: 1222-7, 2010

3. 鈴木浩明, 高橋昭光, 矢藤繁, 小林和人, 古田淳一, 島野仁, 山田信博: 乳児期に著明な高コレステロール血症と黄色腫を発症し、胆汁酸吸着レジンが著効した1症例. *Progress in Medicine* 30: 556-62, 2010

2. 学会発表

1. 藤原和哉, 大崎芳典, 久芳素子, 小林和人, 矢藤繁, 高橋昭光, 鈴木浩明, 島野仁: 糖尿病性足壊疽を契機に家族性高コレステロール血症(FH)が疑われた一例. 第47回日本糖尿病学会関東甲信越地方会, 2010
2. 松田ひとみ, 岡田純代, 矢藤繁, 小林和人, 高橋昭光, 武安法之, 鈴木浩明, 山田信博, 島野仁: 若年急性心筋梗塞を発症した1型糖

尿病の一例. 第47回日本糖尿病学会関東甲信越地方会, 2010

3. 小俣勝哉, 浅野康治郎, 鈴木浩明, 高橋昭光, 小林和人, 矢藤繁, 曾根博仁, 島野仁, 山田信博: 肝細胞癌術後の慢性C型肝炎に対しインターフェロン施行後、1型糖尿病を発症した1例. 第47回日本糖尿病学会関東甲信越地方会, 2010
4. 緒形ひとみ, 清野健, 徳山薫平, 長坂昌一郎, 関澤大輔, 宮本倫聡, 槌田武史, 倉科智行, 齋藤奈緒子, 出口亜希子, 安藤明彦, 高橋仁麗, 岡田健太, 草鹿育代, 石橋俊, 鈴木浩明, 山田信博, 浜野久美子, Struzik Zbigniew, 山本義春: 連続血糖測定(CGM)によって得られたゆらぎに関する検討 DFA法と自己相関関数を用いた解析. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1. 患者背景

	all	不安定プラークなし	不安定プラークあり
	n = 72	n = 51	n = 21
Age (years)	62 ± 11	61 ± 11	65 ± 10
Male/female	40/32	23/28	17/4**
BMI (kg/m ²)	25.7 ± 4.7	25.8 ± 5.1	25.3 ± 3.8
Duration of diabetes (years)	8.5 (3.0-18.0)	7.0 (1.0-7.0)	14.0 (4.5-21.0)
Hypertension (%)	68%	55%	81%
Metabolic syndrome	62%	61%	65%
Systolic blood pressure (mmHg)	136.1 ± 17.6	136.8 ± 17.7	134.2 ± 17.9
Diastolic blood pressure (mmHg)	77.9 ± 11.5	79.5 ± 10.5	73.9 ± 12.1
current smoking (%)	46%	41%	57%
familyhistory of CAD (%)	21%	24%	14%
retinopathy (%)	35%	31%	43%
nephropathy (%)	42%	37%	52%
neuropathy (%)	58%	57%	62%
HbA1c (%)	9.9 ± 2.0	9.5 ± 1.9	9.5 ± 2.1
Fasting plasma glucose (mg/dl)	163 ± 53	169 ± 58	150 ± 36
Total cholesterol (mg/dl)	199 ± 50.4	197 ± 45.6	215 ± 62.3
LDL cholesterol (mg/dl)	121 ± 40.3	116 ± 32.2	141 ± 50.4*
HDL cholesterol (mg/dl)	46.7 ± 18.9	49.9 ± 22.5	42.7 ± 11.2
Non-HDL cholesterol (mg/dl)	152 ± 46	144 ± 35	172 ± 62*
LDL-C/HDL-C ratio	2.86 ± 1.24	2.59 ± 1.02	3.51 ± 1.49*
Triglycerides (mg/dl)	153 ± 74.0	152 ± 76.2	157 ± 70.3
White cell count (x10 ⁹ /L)	6.8 ± 1.7	6.7 ± 1.8	7.2 ± 1.6
C-reactive protein (mg/dl)	0.11(0.08-0.19)	0.12 (0.09-0.19)	0.10(0.07-0.21)
eGFR	83.0 ± 32.3	83.9 ± 36.0	80.7 ± 21.3
statin (%)	42%	37%	52%
RAS inhibitors (%)	38%	35%	47%
aspirin (%)	17%	14%	24%
mean CIMT (mm)	1.10 (0.80-1.50)	0.90 (0.80-1.30)	1.40 (1.05-2.35)**
Max IMT (mm)	2.40 (1.42-3.17)	2.10 (1.20-2.90)	3.00 (2.30-3.60)**
vulnerable carotid plaque	43%	33%	67%*

*p<0.05, **p<0.01

表2. 不安定プラークの数と脂質パラメーターとの関連

	VP0	VP1	VP2	VP3	p value
	n = 51	n = 6	n = 6	n = 9	
Total cholesterol (mg/dl)	190 (177-203)	203 (164-241)	220 (181-260)	232 (199-265)	0.11
LDL cholesterol (mg/dl)	112 (102-123)	126 (109-172)	141 (109-172)	157 (131-183)	0.02
non-HDL cholesterol (mg/dl)	143 (131-154)	152 (119-186)	172 (138-206)	194 (165-222)	0.01
HDL cholesterol (mg/dl)	48 (43-52)	50 (37-63)	48 (35-61)	39 (27-50)	0.43
L/H ratio	2.6 (2.3-2.9)	2.6 (1.8-2.4)	3.2 (2.4-4.1)	4.2 (3.5-4.9)	< 0.01
Triglycerides (mg/dl)	150 (129-171)	133 (73-193)	158 (97-219)	182 (131-233)	0.6

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
林 登志雄	骨粗鬆症	渡邊裕司	疾患からみた薬理学	じほう社	東京	2011	印刷中
Iwamoto N, Harada-Shi ba M	Intratracheal gene transfer using polyplex nanomicelles and their application to cardiology	Victor R. Preedy	Nanomedicine and Cardiovascular System	Science and Publisher	New Hampshire, USA	未定	未定

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
野口徹, 川尻剛照, 多田隼人, 野原淳, 小林淳二, 馬淵宏	PCSK9 遺伝子変異と LDL 受容体遺伝子変異を合併したホモ接合体性家族性高コレステロール血症の一例	The Lipid	21	286-291	2010
Noguchi T, Katsuda S, Kawashiri M, Tada H, Nohara A, Inazu A, Yamagishi M, Kobayashi J, Mabuchi M	The E32K variant of PCSK9 exacerbates the phenotype of familial hypercholesterolaemia by increasing PCSK9 function and concentration in the circulation	Atherosclerosis	210	166-172	2010
Takeuchi Y, Yahagi N, Izumida Y, Nishimura M, Kubota M, Teraoka Y, Yamamoto T, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Sekiya M, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Gotoda T, Ishibashi S, Itaka K, Kataoka K, Nagai R, Yamada N, Kadowaki T, Shimano H.	Polyunsaturated fatty acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and autoloop regulatory circuit.	J Biol Chem.	285 巻 15 号	11681-11691	2010 年

Kuroda M, Aoyagi Y, Asada S, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, Machida K, Matsumoto F, Satoh K, Aso M, Saito Y.	Ceiling culture-derived proliferative adipocytes are a possible delivery vehicle for LCAT protein replacement therapy.	Open Gene Ther. J.		in press	2011
Asada S, Kuroda M, Aoyagi Y, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, Aso M, Saito Y.	Disturbed apolipoproteinA-I containing lipoproteins in fish eye disease is improved by lecithin: cholesterol acyltransferase produced by the gene-transduced adipocytes	Mol. Genet. Metab.	102(2)	229-231	2011
黒田正幸、武城英明	脂肪細胞による新規蛋白質補充療法—LCAT 欠損症遺伝子治療臨床研究—	医学のあゆみ	233	1246-1247	2010
Hayashi T, Iguchi A	Possibility of the regression of atherosclerosis through the prevention of endothelial senescence by the regulation of nitric oxide and free radical scavengers.	Geriatr Gerontol Int	10	115-130	2010
Kishimoto N, Hayashi T, Sakuma I, Kano-Hayashi H, Tsunekawa T, Osawa M, Ina K, Iguchi A	A hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor improves endothelial function within 7 days in patients with chronic hemodialysis.	Int..J. Cardiol.	145	21-26	2010
. Ochiai M, Hayashi T, Morita M, Ina K, Maeda M, Watanabe F, Morishita K	Short-term effects of L-citrulline supplementation on arterial stiffness in middle-aged men	Int..J. Cardiol.	146	(in press)	2011
Kang J, Tachibana Y, Kanata W, Mahara A, Harada-Shiba M, Yamaoka T	Liver-targeted siRNA delivery by polyethylenimine(PEI)-pullulan carrir	Bioorganic & Medicinal Chemistry	Vol.18	3946-3950	2010 年
Fujita Y, Kakino A, Harada-Shiba M, Sato Y, Otsui K, Yoshimoto R, and Sawamura T	C-Reactive Protein Yptake by Macrophage Cell Line via Class-A Scavenger Receptor	Clinical Chemistry	Vol.56, No.3	478-481	2010 年
Harada-Shiba M, Sugisawa T, Makino H, Abe M, Tsushima M, Yoshimasa Y, Yamashita T, Miyamoto Y, Yamamoto A, Tomoike H, Yokoyama S	Impact of statin treatment on the clinical fate of heterozygous familial hypercholesterolemia	Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	Vol.17, No.7	667-674	2010 年

斯波真理子	家族性高コレステロール血症 (FH)	循環器病研究の進歩 (通巻 50号)	Vol.XXXI No.1	25-33	2010年
山本剛史, 斯波真理子	LDL受容体のあらたな制御機構と治療戦略	医学のあゆみ	Vol.234 Nos.7,8	754-757	2010年
斯波真理子, 山下貴裕	ARHとPCSK9	Medical Practice	Vol.27 No.03	494-495	2010年
斯波真理子, 山下貴裕	家族性高コレステロール血症の治療	Medical Practice	Vol.27 No.03	527-532	2010年
D.Masuda, Y.Nakagawa-Toyama, K.Nakatani, M.Inagaki, K.Tsubakio-Yamamoto, J.C.Sandoval, T.Ohama, M.Nishida, M.Ishigami, S.Yamashita	Ezetimibe improves postprandial hyperlipidaemia in patients with type Iib hyperlipidemia	Eur J Clin Invest	39(8)	689-698	2009
J.C.Sandoval, Y.Nakagawa-Toyama, Y.Tochino, D.Masuda, K.Tsubakio-Yamamoto, K.Nakatani, M.Inagaki, T.Ohama, M.Nishida, M.Ishigami, I.Komuro, S.Yamashita	Fenofibrate reduces postprandial hypertriglyceridemia in CD36 null mice	J Atherosclerosis in Thromb	17(6)	610-618	2010
J.C.Sandoval, Y.Nakagawa-Toyama, D.Masuda, Y.Tochino, H.Nakaoka, R.Kawase, M.Yuasa-Kawase, K.Nakatani, M.Inagaki, K.Tsubakio-Yamamoto, T.Ohama, A.Matsuyama, M.Nishida, M.Ishigami, I.Komuro, S.Yamashita	Molecular mechanisms of ezetimibe-induced attenuation of postprandial hypertriglyceridemia	J Atherosclerosis in Thromb	17(9)	914-924	2010
Yamada M, Aoyama T, Arai H, Nagai K, Tanaka B, Uemura K, Mori S, Ichihashi N	Dual-task walk is a reliable predictor of falls in robust elderly adults.	J Am Geriatr Soc	59	163-164	2011

Arai H, Yamamoto A, Matsuzawa Y, Saito Y, Yamada N, Oikawa S, Mabuchi H, Teramoto T, Sasaki J, Nakaya N, Itakura H, Ishikawa Y, Ouchi Y, Horibe H, and Kita T.	Prevalence of the Metabolic Syndrome in elderly and middle-aged Japanese.	J Clin Geriat Gerontol	1	42-47	2010
Arai H, Hiro T, Kimura T, Morimoto T, Miyauchi K, Nakagawa Y, Yamagishi M, Ozaki Y, Kimura K, Saito S, Yamaguchi T, Daida H, Matsuzaki M.	More Intensive Lipid Lowering is associated with Regression of Coronary Atherosclerosis in Diabetic Patients with Acute Coronary Syndrome: Sub-analysis of JAPAN-ACS study	J Atheroscler Thromb	17	1096-1107	2010
Satoru Kodama, Kazumi Saito, Shiro Tanaka, Chika Horikawa, Aki Saito, Yoriko Heianza, Yui Anasako, Yukako Nishigaki, Yoko Yachi, Kaoruko Tada Iida, Yasuo Ohashi, Nobuhiro Yamada, Hirohito Sone,	Alcohol Consumption and Risk of Atrial Fibrillation	Journal of the American College of Cardiology	Vol. 57, No. 4,	427-36	2011
Mihoko Asumi, Tatsuo Yamaguchi, Kazumi Saito, Satoru Kodama, Hidemitsu Miyazawa, Hiroshige Matsui, Emiko Suzuki, Hiroshi Fukuda, Hirohito Sone,	Are serum cholesterol levels associated with silent brain infarcts? The Seiryō Clinic Study	Atherosclerosis	210	674-677	2010
S. Katayama & T. Moriya & S. Tanaka & S. Tanaka & Y. Yajima & H. Sone & S. Iimuro & Y. Ohashi & Y. Akanuma & N. Yamada & for the Japan Diabetes Complications Study Group	Low transition rate from normo- and low microalbuminuria to proteinuria in Japanese type 2 diabetic individuals: the Japan Diabetes Complications Study (JDACS)	Diabetologia			2010

〈連載〉 症例検討

脂質代謝異常症 への 多角的アプローチ 96

PCSK9 遺伝子変異と LDL 受容体遺伝子変異を合併したホモ接合体性家族性高コレステロール血症の一例

金沢大学大学院医学系研究科脂質研究講座 特任助教 野口 徹
同 循環医科学専攻臓器機能制御学 助教 川尻 剛照
同 循環医科学専攻臓器機能制御学 医員 多田 隼人
同 脂質研究講座 特任助教 野原 淳
同 脂質研究講座 特任教授 小林 淳二
同 脂質研究講座 特任教授 馬淵 宏

はじめに

日常臨床で遭遇する高コレステロール血症は、動脈硬化症、特に冠動脈硬化症の主な原因疾患である。原発性高脂血症の多くは遺伝要因を基盤として発症すると考えられ、単一遺伝子疾患で最も重症な高脂血症は家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia; FH) である。

FHは、臨床的に高LDLコレステロール (LDL-C) 血症、腱黄色腫、および早発性冠動脈硬化症を3主徴とする常染色体優性遺伝性疾患である。ヘテロ接合体性FHは一般人口500人に1人以上と、高頻度に存在すると考えられている。FHは主としてLDL受容体 (LDLR) 遺伝子異常が原因であり、われわれの検討では、FHと臨床診断された症例の62.5%がLDLR遺伝子変異を有していた¹⁾。また、LDLRに対するリガンドであるアポリポ蛋白B (アポB) の遺伝子変異を原因とする familial defective

apolipoprotein B-100 (FDB) も、FHの臨床像を呈する。東欧ではFHと診断された患者の10%程度と高頻度であるが²⁾、わが国では存在しないかきわめて低頻度であることをわれわれは報告している³⁾。

近年、LDLR、アポBに加え、proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) 遺伝子変異もFH様症状の病因となることが注目されている。PCSK9はセリンプロテアーゼの一種で、肝臓や小腸などから血中に分泌され、主に肝臓のLDLR分解を亢進して細胞膜表面のLDLR量を低下させることで、血中のLDL-C濃度に影響を与える。そのため、機能亢進型変異では高脂血症⁴⁾、機能低下型変異では低脂血症⁵⁾を呈する。わが国においては、機能亢進型PCSK9 E32K変異が遺伝性高脂血症の原因として高頻度に存在することをわれわれは報告した⁶⁾。欧米で報告されているPCSK9 D374Yなどの機能亢進型PCSK9変異はFHと同等の脂質値を示すが⁷⁾、PCSK9 E32K変異ではFHに比して臨床像が軽

症であった。

本稿では、ホモ接合体性FHの臨床像を呈する症例の中からわれわれが見出した、PCSK9 E32K変異とLDLR遺伝子変異のダブルヘテロ接合体症例の臨床所見および治療効果について、文献的考察を加えて報告する。

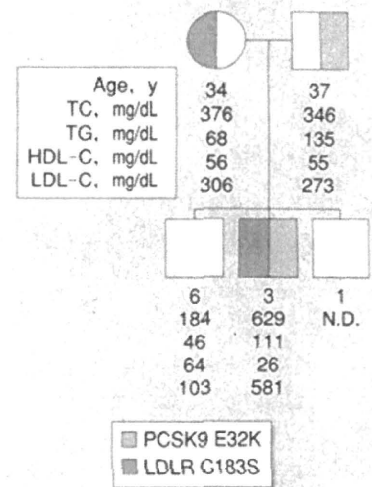
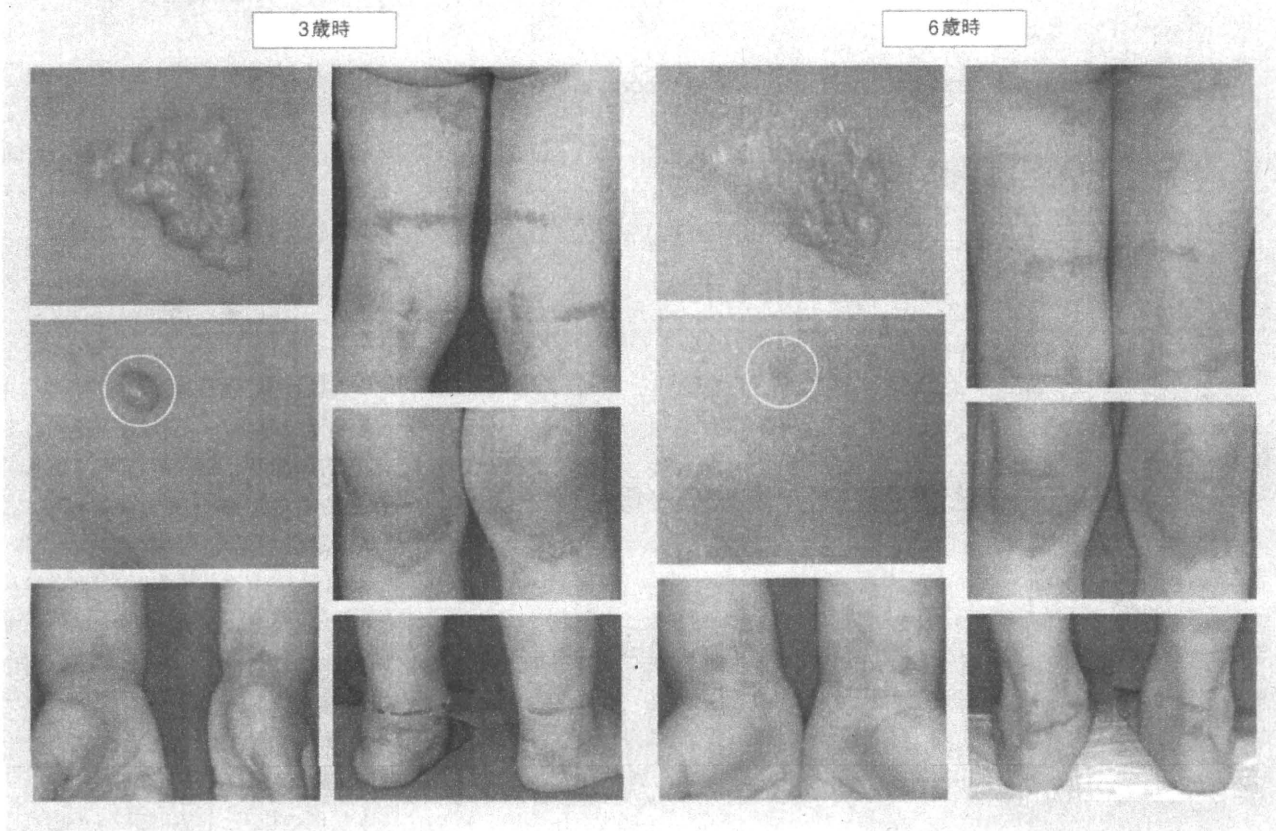


図1 家系図および脂質プロフィール



図② 本症例の黄色腫

症例

症例：3歳の男児（紹介受診当時）。

家族歴：両親に血族結婚なし（図①，家系図参照）。

病歴：2003年7月（満1歳2ヵ月），手関節および足関節に黄色腫を認めたため，近医を受診した。総コレステロール（TC）629mg/dL，トリグリセライド（TG）111mg/dL，HDLコレステロール（HDL-C）

26mg/dL，LDL-C 581mg/dLと著明な高LDL-C血症が認められ，臨床的にホモ接合体性FHと診断された。3歳時に精査加療目的に当科に紹介受診となった。

身体所見（紹介受診当時）：身長99.5cm（+0.7 SD），体重14.3kg（-0.2 SD），眼瞼黄色腫なし，角膜輪なし，頸部リンパ節腫脹なし，甲状腺腫なし，両手首，両足首，両肘，両膝，両大腿屈側などに広がる全身性の皮膚黄色腫あり（図②）。

一般検査成績：AST 27IU/L，ALT 12IU/L， γ -GTP 10IU/L，LDH 248IU/L，BUN 12mg/dL，Cr 0.22mg/dL，CK 147IU/L，ALP 1,018IU/L，WBC 7,800/ μ L，RBC $447 \times 10^4/\mu$ L，Hb 11.8g/dL，Ht 35.2%，Plt $230 \times 10^4/\mu$ L，TC 599mg/dL，TG 61mg/dL，HDL-C 33mg/dL，LDL-C 519mg/dL，apo AI 90mg/dL，AII 23mg/dL，B 277mg/dL，CII 3.3mg/dL，CIII 7.0mg/dL，E 6.9mg/dL，Lp

治療経過

2005年6月からビタバスタチン4mg内服加療を開始、2007年8月よりエゼチミブ10mgを追加し、LDL-Cは271mg/dLまで改善した(図4)。これに伴い、皮膚黄色腫は著明に改善した(図5)。

考察

ホモ接合体性FHは、約100万人に1人の頻度で見られるまれな疾患であるが、FHの極型ともいえる重篤な臨床症状を呈する。わが国ではこれまで、LDLR遺伝子変異1種類のホモ接合体、もしくはLDLR遺伝子変異2種類の組み合わせによる複合ヘテロ接合体のみが報告されてきた。今回、われわれはPCSK9 E32K変異とLDLR C183S変異のダブルヘテロ接合体でもホモ接合体性FHの臨床像を呈することを見出した。

本症例のLDL-C値は581mg/dLで、それぞれのヘテロ接合体である両親(平均LDL-C 290mg/dL)の2倍、変異非保有同胞(LDL-C 103mg/dL)の約5.6倍であった。未治療時の黄色腫の部位および程度は、LDLR遺伝子変異ホモ接合体の小児と同様であり、また、3歳時ですでに内膜中膜複合体の肥厚(0.4mm)が観察された。ホモ接合体性FHでは冠動脈硬化症や大動脈弁上狭窄症が生命予後を規定し、十分なコレステロール低下療法が行われない場合には、平均33歳で心臓死に至る⁶⁾。したがって、ホモ接合体性FHの生命予後を改善するに

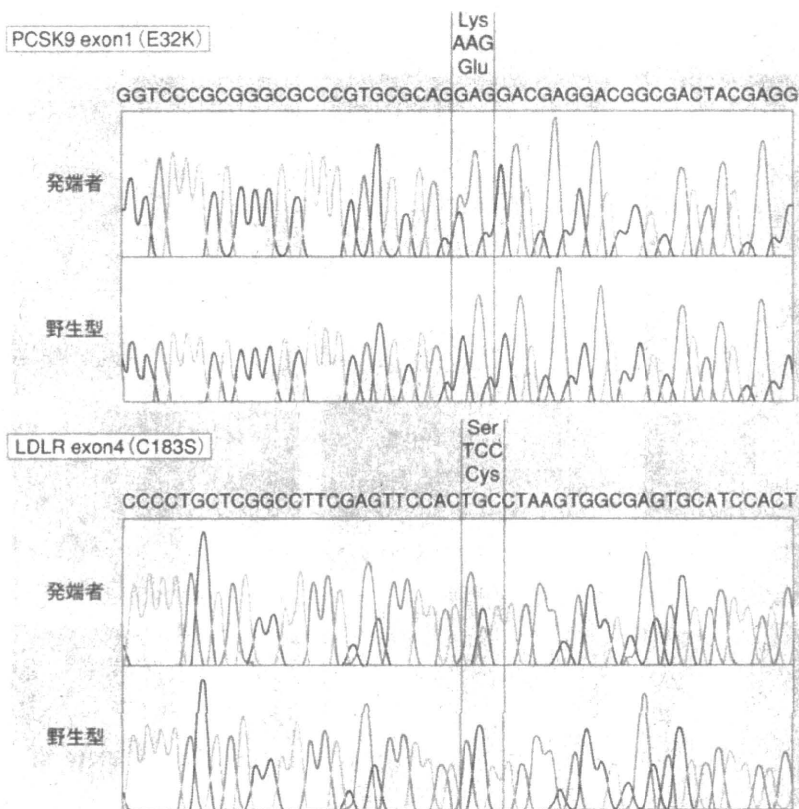


図3 本症例の遺伝子解析

(a) 34.2mg/dL

頸動脈エコー所見：内膜中膜複合体の肥厚(0.4mm)が観察された。

遺伝子解析

末梢白血球から抽出したDNAを用いたLDLR遺伝子解析にて、母方由来のLDLR C183S (c.611G>C)変異が確認されたが、ダイレクトシーケンスによ

る全エクソンの精査、およびMultiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法による大規模欠失・重複変異の検索でも、父方由来のLDLR遺伝子変異は見出されなかった。また、FDBの病因変異も認められなかったため、さらにPCSK9遺伝子の解析を行ったところ、父方由来の機能亢進型PCSK9 E32K (c.94G>A)変異が確認された(図1, 3)。

は、早期からの有効なコレステロール低下療法の導入が必要である。

LDLR遺伝子変異ホモ接合体は正常なLDLRを発現しないため、肝細胞でのLDLR発現誘導を介してLDL-Cを低下させるスタチンなどの薬物療法では、有効なコレステロール値の低下は困難で

あることが多い。例外的に、臨床像が軽症であるとされるLDLR L547V変異¹¹⁾との組み合わせでは、LDLR遺伝子変異複合ヘテロ接合体であっても薬剤治療反応性が比較的良好な場合がある。一般的には、ホモ接合体性FHの治療には体外循環によりLDLなどのアポB含有リ

ポ蛋白粒子を直接除去するLDLアフェレーシス療法が絶対適応とされている。

一方、本症例ではピタバスタチン4mgの内服加療によりLDL-Cは300mg/dL程度まで低下し、エゼチミブ10mg追加によりさらに低下して初期値の50%以下の271mg/dLまで改善した(図4)。コレステロール値の低下とともに、全身性に認められた皮膚黄色腫の大部分が退縮・退色しており(図2)、この点からも薬剤による治療の有効性が示された。われわれは本症例のほかにも3例のPCSK9 E32K/LDLR遺伝子変異ダブルヘテロ接合体を見出しており、また、世界でも報告のない機能亢進型PCSK9変異ホモ接合体も2例見出した(表)。いずれの症例でも、本症例と同様に薬剤に対する反応性は良好であった。FDBとLDLR遺伝子変異のダブルヘテロ接合体でもLDLR遺伝子変異ホモ接合体に比して軽症であり、薬剤にも反応するという報告があることから¹⁰⁾、正常LDLR

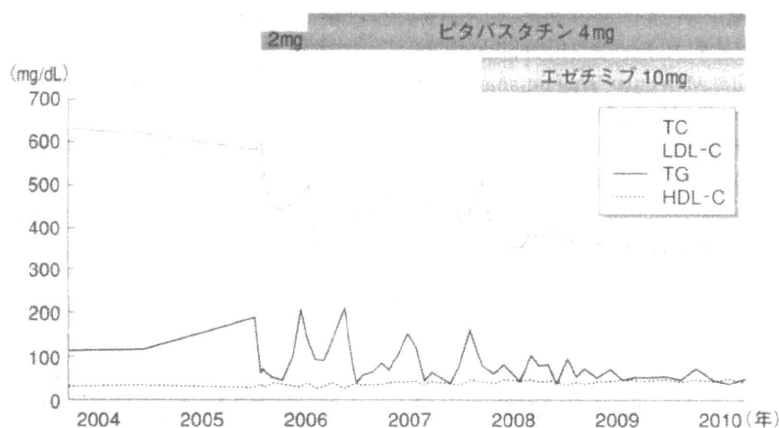


図4 臨床経過図

表 PCSK9遺伝子異常症の自験例

No.	遺伝子変異	性	年齢(歳)	黄色腫	TC (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)
1	PCSK9 E32K LDLR C183S	男性	2	重度の皮膚黄色腫	629	111	26	581
2	PCSK9 E32K LDLR C292X	男性	33	重度のアキレス腱黄色腫 (右32mm, 左30mm)	520	287	38	425
3	PCSK9 E32K LDLR K790X	男性	1	重度の皮膚黄色腫	345	226	52	248
4	PCSK9 E32K LDLR IVS15-3C/A	男性	47	アキレス腱黄色腫(右15mm, 左16mm) 骨膜下黄色腫	504	234	41	416
5	PCSK9 E32K PCSK9 E32K	女性	52	アキレス腱黄色腫(右10mm, 左11mm)	420	153	50	339
6	PCSK9 E32K PCSK9 E32K	女性	43	アキレス腱黄色腫(右11mm, 左9mm)	322	173	53	246

を発現しうることが良好な治療反応性に結びついていると考えられる。本症例のように薬物療法で十分な効果が期待できるのか、あるいはLDLアフェレーシスが必要なのかを判断し、適切な治療法を選択する上で、臨床的にホモ接合体性FHと診断された症例の病因遺伝子変異の特定は非常に重要である。

われわれの検討において、PCSK9 E32K変異保有者では、PCSK9蛋白の機能増強および血中濃度上昇の双方を介して高脂血症となることが示唆されている⁶⁾。PCSK9の異常が高脂血症の原因となっているこれらの症例では、近年開発が進んでいるアンチセンスオリゴヌクレオチド¹¹⁾、RNAi¹²⁾、抗PCSK9抗体¹³⁾、epidermal growth factor-like repeat Aペプチド¹⁴⁾などのPCSK9阻害薬が、根本的な治療法として奏効する可能性がある。スタチンによりPCSK9の血中濃度が上昇するという報告もあり¹⁵⁾、スタチン服用時の有力な併用薬としての可能性も併せ、PCSK9阻害薬の実用化が待たれる。

おわりに

ホモ接合体性FHの臨床像を呈するPCSK9 E32K/LDLR C183Sダブルヘテロ接合体を経験し、薬剤による治療効果について評価した。本症例はLDLR遺伝子変異ホモ接合体に比して薬剤に良好に反応し、血清TC値の低下とともに皮膚黄色腫の著明改善が観察された。FHの遺伝子診断の意義を考察する上で

も、遺伝子診断が治療選択と結びつく可能性を示唆する重要な症例と考え報告した。

謝 辞

厚生労働省難治性疾患克服研究事業「原発性高脂血症に関する調査研究」(平成20~21年度)の支援を受けた。

文 献

- 1) Yu W, Nohara A, Higashikata T et al: Molecular genetic analysis of familial hypercholesterolemia: spectrum and regional difference of LDL receptor gene mutations in Japanese population. *Atherosclerosis* **165** (2): 335-342, 2002
- 2) Rašlová K, Gašparovic J, Freiberger T: Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolemia in Central-Eastern European Countries. *Atherosclerosis Supplements* **6** (1): 178-179, 2005
- 3) Nohara A, Yagi K, Inazu A et al: Absence of familial defective apolipoprotein B-100 in Japanese patients with familial hypercholesterolemia. *Lancet* **345** (8962): 1438, 1995
- 4) Abifadel M, Varret M, Rabès JP et al: Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* **34** (2): 154-156, 2003
- 5) Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK et al: Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet* **37** (2): 161-165, 2005
- 6) Noguchi T, Katsuda S, Kawashiri MA et al: The E32K variant of PCSK9 exacerbates the phenotype of familial hypercholesterolemia by increasing PCSK9 function and concentration in the circulation. *Atherosclerosis* **210** (1): 166-172, 2010
- 7) Leren TP: Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet* **65** (5): 419-422, 2004
- 8) Mabuchi H, Miyamoto S, Ueda K et al: Causes of death in patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **61** (1): 1-6, 1986
- 9) Miyake Y, Yamamura T, Sakai N et al: Update of Japanese common LDLR gene mutations and their phenotypes: Mild type mutation I547V might predominate in the Japanese population. *Atherosclerosis* **203** (1): 153-160, 2009
- 10) Benlian P, de Gennes JL, Dairou F et al: Phenotypic expression in double heterozygotes for familial hypercholesterolemia and familial defective apolipoprotein B-100. *Hum Mutat* **7** (4): 340-345, 1996
- 11) Graham MJ, Lemonidis KM, Whipple CP et al: Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *J Lipid Res* **48** (4): 763-767, 2007
- 12) Frank-Kamenetsky M, Grefhorst A, Anderson NN et al: Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA* **105** (33): 11915-11920, 2008
- 13) Duff CJ, Scott MJ, Kirby IT et al: Antibody-mediated disruption of

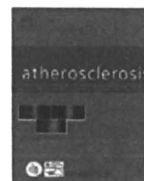
the interaction between PCSK9 and the low-density lipoprotein receptor. *Biochem J* **419**(3): 577-584, 2009

- 14) Shan L, Pang L, Zhang R et al: PCSK9 binds to multiple receptors

and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. *Biochem Biophys Res Commun* **375**(1): 69-73, 2008

- 15) Dubuc G, Chamberland A, Wassef H et al: Statins upregulate PCSK9,

the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(8): 1454-1459, 2004



The E32K variant of PCSK9 exacerbates the phenotype of familial hypercholesterolaemia by increasing PCSK9 function and concentration in the circulation

Tohru Noguchi^{a,*}, Shoji Katsuda^b, Masa-aki Kawashiri^b, Hayato Tada^b, Atsushi Nohara^a, Akihiro Inazu^c, Masakazu Yamagishi^b, Junji Kobayashi^a, Hiroshi Mabuchi^a

^a Department of Lipidology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Takara-machi 13-1, Kanazawa 920-8640, Japan

^b Division of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Japan

^c Laboratory Science, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2009

Received in revised form

13 November 2009

Accepted 14 November 2009

Available online 20 November 2009

Keywords:

Familial hypercholesterolaemia

PCSK9

LDLR

Mutation

ABSTRACT

Objective: Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) regulates cholesterol trafficking by mediating degradation of cell-surface LDL receptors (LDLR). Gain-of-function PCSK9 mutations are known to increase plasma LDL-C levels. We attempted to find gain-of-function PCSK9 mutations in Japanese subjects and determine the frequency and impacts of these mutations, especially on circulating PCSK9 and LDL-C levels.

Methods: PCR-SSCP followed by direct sequence analysis was performed for all 12 exons and intronic junctions of the PCSK9 in 55 subjects with clinically diagnosed familial hypercholesterolaemia (clinical-FH), who were confirmed to have no LDLR mutations. Among the mutations detected, PCSK9 E32K was likely to be a gain-of-function mutation, and screening was performed by PCR-RFLP in clinical-FH and general Japanese controls. The levels of PCSK9 in plasma from subjects and in media of HepG2 cells transfected with PCSK9 constructs were measured by ELISA.

Results: We detected 7 PCSK9 variants, including E32K. The frequency of PCSK9 E32K in clinical-FH (6.42%) was significantly higher than that in controls (1.71%). Three cases representing homozygous FH phenotypes were double heterozygous for PCSK9 E32K and LDLR C183S, C292X or K790X. Two cases were true homozygous for PCSK9 E32K; to our knowledge, these are the first true homozygotes for gain-of-function PCSK9 mutations reported to date. The PCSK9 E32K mutant had over 30% increased levels of PCSK9 in plasma from the subjects and in media of transiently transfected HepG2 cells as compared with those in controls. Furthermore, LDL-C levels in the PCSK9 E32K true homozygotes and heterozygotes were 2.10- and 1.47-fold higher than those in controls with comparable circulating PCSK9 levels, respectively, suggesting enhanced function of PCSK9 E32K.

Conclusions: We found 2 true homozygotes for PCSK9 E32K and 3 double heterozygotes for PCSK9 E32K and LDLR mutations associated with autosomal dominant hypercholesterolaemia. This study provided evidence that PCSK9 E32K significantly affects LDL-C levels via increased mass and function of PCSK9, and could exacerbate the clinical phenotypes of patients carrying LDLR mutations.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is the ninth member of the subtilisin-like serine convertase superfamily [1,2]. PCSK9 regulates plasma levels of LDL-cholesterol (LDL-C) by directing cell-surface LDL receptors (LDLR) to the lysosomes for degradation, resulting in reduced clearance and accumulation of LDL-C in the circulation [3]. PCSK9 muta-

tions that increase the degradation of LDLR are referred to as gain-of-function mutations and cause autosomal dominant hypercholesterolaemia (ADH) and premature coronary artery disease (CAD) [4]. Conversely, loss-of-function mutations in PCSK9, which decrease LDLR degradation, are associated with hypocholesterolaemia and less frequencies of CAD [5,6].

In the Japanese population, 60–70% of cases of ADH are caused by LDLR mutation, and no apolipoprotein B mutations have been identified to date [7,8]. Thus, gain-of-function PCSK9 mutations could explain a part of the remaining 30% of ADH cases in the Japanese population.

* Corresponding author. Tel.: +81 76 265 2261; fax: +81 76 234 4271.

E-mail address: nogutito@med.kanazawa-u.ac.jp (T. Noguchi).

The only known function of PCSK9 as a convertase is in auto-catalytic processing at the VFAQ152↓SIP site [2], and unlike the other proprotein convertases, PCSK9 does not appear to undergo a second cleavage event to release an active convertase [9,10]. The prodomain of PCSK9, which binds non-covalently to the mature convertase, acts as a chaperone to assist the folding of the mature convertase and also blocks access to the catalytic site of the mature convertase [1]. It is suggested from these mechanisms that mutations in the prodomain of PCSK9 can markedly affect the function of PCSK9; in fact, many gain-of-function mutations and loss-of-function mutations in the prodomain region have been reported with almost the same frequency as those in the catalytic domain and C-terminal region [11–13].

Enzyme-linked immunoassays for measuring plasma PCSK9 have been established recently, and circulating levels of PCSK9 as well as sequence variations in PCSK9 have been shown to affect plasma levels of LDL-C [4,14]. However, the relationship between mutations and circulating PCSK9 levels *in vivo* has not been fully elucidated [15,16]. Characterisation of the effects of naturally occurring gain-of-function mutations in PCSK9 on circulating PCSK9 and LDL-C levels may provide important insight into the mechanism by which PCSK9 degrades LDLR.

In this study, we identified a gain-of-function PCSK9 mutation in the prodomain region and clarified their lipid profiles and circulating PCSK9 levels in comparison to LDLR mutation heterozygotes. We also present data on gain-of-function PCSK9 mutation true homozygotes and double heterozygotes with LDLR mutations, providing meaningful perspectives regarding the function of PCSK9.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

In this study, we analysed 514 unrelated patients with clinically diagnosed familial hypercholesterolaemia (clinical-FH) attending the lipid clinic of Kanazawa University Hospital or the affiliated clinics in the Hokuriku district and 351 general Japanese men attending the medical clinic for their annual health examinations in the same district as controls. The diagnosis of FH was made according to the following criteria: (1) primary hypercholesterolaemia (total cholesterol above 230 mg/dL) with tendon xanthomas or (2) primary hypercholesterolaemia with and without tendon xanthomas in first-degree relatives of hypercholesterolaemic patients [17].

Screening was performed in the 514 subjects with clinical-FH, and 262 (51.0%) were confirmed to have mutations in LDLR. The two most common LDLR mutations were c.2431A>T mutation in exon 17 (K790X, 16.8%) and c.2312-3C>A mutation in the splice acceptor region of intron 15 (IVS15-3C/A, 4.5%). Of the remaining 252 subjects whose mutations were unidentified, 55 subjects were randomly assigned to a PCSK9 mutation screening study to detect gain-of-function PCSK9 mutations. Among the sequence variations detected, the relatively common c.94G>A variant (E32K) in the prodomain region of PCSK9 was likely to be a gain-of-function mutation, and a larger scale screening was performed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) in 514 clinical-FH and 351 general Japanese controls to determine the frequency of the PCSK9 E32K variant. Relatives of PCSK9 E32K carriers were further screened for PCSK9 E32K and LDLR mutations.

2.2. Lipids and PCSK9 measurements

Serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and HDL-cholesterol (HDL-C) concentrations were determined at accredited

clinical laboratories using routine clinical methods. LDL-cholesterol (LDL-C) concentrations were calculated using the Friedewald equation as there were no subjects with serum triglycerides >400 mg/dL in the present study population. To distinguish the effects of gene mutations on circulating PCSK9 and LDL-C levels, plasma PCSK9 concentrations were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit targeting human PCSK9 (CycLex, Nagano, Japan) in 2 PCSK9 E32K true homozygotes, 15 PCSK9 E32K heterozygotes, 30 LDLR mutation heterozygotes (20 K790X and 10 IVS15-3C/A) and 20 control subjects. Lipid profile analysis and PCSK9 ELISA were performed using fasting blood samples collected when subjects were not taking any lipid-lowering drugs. Written informed consent was obtained from each of the subjects prior to participation in the study. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Graduate School of Medical Science, Kanazawa University.

2.3. DNA analysis

Genomic DNA was prepared from white blood cells using a Genomic DNA Purification Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA). Primers covering all of the exons and exon-intron boundary sequence of LDLR and PCSK9 were designed using Primer3 online software (<http://frodo.wi.mit.edu/>). LDLR mutations were identified using the Invader assay method (Third Wave Technologies, Inc., Madison, WI, USA) for 32 point mutations previously identified in Japan, the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method for large rearrangements using a P062B LDLR MLPA kit (MRC Holland, Amsterdam, Netherlands) and DNA sequencing method using a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for the other mutations. MLPA and direct sequencing were performed on an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Mutations in PCSK9 were detected by polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformational polymorphism (SSCP) followed by direct-sequence analysis. SSCP analysis was performed as described previously [18]. PCSK9 E32K mutation in exon 1 of the PCSK9 gene was determined using a PCR-RFLP method with primers 5'-TGAACCTCAGCTCCTGCACA-3' and 5'-AACGCAAGGCTAGCACCA-3'. PCR products were digested at 37 °C overnight with 1 U of the restriction enzyme BslI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). RFLP assay was designed such that the normal PCSK9 sequence would be cut twice to generate fragments of 34, 49 and 171 bp and the E32K sequence would be cleaved once to generate fragments of 34 and 220 bp, to check that the restriction enzyme was digesting properly. PCR conditions for SSCP, RFLP and DNA sequencing were as follows. Each 25- μ L reaction mixture contained 60 ng of DNA, 10 pmol of each primer, 0.25 mM of each dNTP and 1 U Taq polymerase (Biotech International, Perth, Australia) in PCR buffer containing 1.5 mM MgCl₂. Cycling conditions were 95 °C for 5 min followed by 5 cycles of step-down PCR consisting of 95 °C for 5 s, annealing temperature +5 °C for 30 s (decrease 1 °C each cycle) and 72 °C for 1 min, then 30 cycles of 95 °C for 5 s, annealing temperature for 30 s and 72 °C for 1 min, with a final extension for 5 min at 72 °C.

2.4. In vitro expression of PCSK9

The WT-PCSK9 plasmid (pCMV-PCSK9-FLAG) containing the sequence of the FLAG epitope tag fused to the 3' end of the PCSK9 coding sequence, was a generous gift from Dr. Jay D. Horton, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA. To make the E32K-PCSK9 construct, PCR fragments containing the PCSK9 E32K mutant sequence were generated from the genomic DNA of a PCSK9 E32K homozygote with the primers used for RFLP.

Table 1
Distribution of PCSK9 E32K mutation in a general Japanese population by LDL-cholesterol quintile.

	LDL-C quintile					Total (n=351)	ANOVA P value
	1 (n=69) LDL-C 47.8–88.1	2 (n=70) LDL-C 88.2–104.3	3 (n=72) LDL-C 104.4–122.5	4 (n=70) LDL-C 122.6–138.9	5 (n=70) LDL-C 139.0–222.4		
Number of PCSK9 E32K carrier	0	0	0	4	2	6	
%	0	0	0	5.71	2.86	1.71	
Age (years)	43.3 ± 12.2	47.3 ± 9.1	43.1 ± 9.4	46.8 ± 9.8	49.0 ± 7.4	45.9 ± 9.9	<0.001
TC (mg/dL)	146.3 ± 18.0	170.5 ± 13.9	184.6 ± 14.0	203.1 ± 12.3	225.2 ± 19.4	186.0 ± 31.2	<0.001
TG (mg/dL)	111.2 ± 73.9	118.2 ± 59.0	112.3 ± 62.9	110.2 ± 46.4	125.6 ± 53.3	115.5 ± 59.7	0.517
HDL-C (mg/dL)	51.9 ± 11.6	50.3 ± 14.0	49.9 ± 11.7	51.4 ± 11.4	46.0 ± 11.2	49.9 ± 12.1	<0.05
LDL-C (mg/dL)	72.2 ± 10.9	96.5 ± 5.4	112.2 ± 5.4	129.7 ± 4.4	154.1 ± 14.0	113.0 ± 29.2	<0.001

HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; TC, total cholesterol; TG, triglyceride.

Amplified fragments and pCMV-PCSK9-FLAG were digested at 37 °C overnight with the restriction enzymes NheI and SacII (New England Biolabs), purified with a QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and ligated using T4 DNA ligase (Nippon Gene, Toyama, Japan). The whole coding sequence of the E32K-PCSK9 plasmid except for the G to A substitution at the position of E32K was confirmed to be identical to the WT-PCSK9 plasmid by DNA sequencing method. An empty plasmid, pCDNA3.1/myc his-c (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used as a control in the transfection experiments.

HepG2 cells obtained from the Health Science Research Resources Bank (HSRRB) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with low glucose and L-alanyl-glutamine (Gibco, Carlsbad, CA, USA) containing 1× penicillin-streptomycin solution (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) and 10% foetal bovine serum (Gibco) in a humidified atmosphere (37 °C, 5% CO₂). HepG2 cells were then transiently transfected with the different PCSK9 constructs or empty plasmid using Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's instructions for the 24-well plates. PCSK9 levels in the media were determined using an ELISA kit after 24 h of incubation. The experiment was repeated 3 times with 4 wells in each group. Data were collected as the ratio to the WT-PCSK9 plasmid, and mean values were calculated.

2.5. Statistics

All data in the text and figures are expressed as means ± S.D. The frequency distribution of genotype was compared using standard χ^2 test. For multiple comparisons, the Tukey–Kramer HSD test was performed for variables with $P < 0.05$ on F -test in one-way ANOVA. Linear correlations were analysed using Pearson's correlation coefficient analysis. JMP 5.1.2 software (SAS Institute, Cary, NC, USA) was used for statistical analyses. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Identification of the LDLR and PCSK9 mutations

Screening of LDLR mutations in 514 clinical-FH subjects resulted in detection of 52 point mutations and 11 large rearrangements in 210 and 52 patients, respectively. Twenty-two of 55 randomly selected subjects who were free from LDLR mutations had the following PCSK9 sequence variants: c.61_63dupCTG (L21dup, 8 heterozygotes), c.94G>A (E32K, 1 true homozygote and 2 heterozygotes), c.158C>T (A53V, 1 heterozygote), c.787G>A (G263S, 2 heterozygotes), c.1420A>G (I474V, 4 heterozygotes), c.2004C>A (S668R, 1 heterozygote) and c.2009A>G (E670G, 3 heterozygotes). Silent mutations that do not result in a change in the amino acid sequence of the protein product or occur within intronic regions were omitted. The PCSK9 E32K true homozygote showed markedly

higher plasma LDL-C level than the 2 heterozygotes (339 mg/dL vs. 222 and 248 mg/dL).

3.2. Screening of E32K mutation in exon 1 of the PCSK9 gene

Genotyping of the PCSK9 E32K mutation in the general population indicated that PCSK9 E32K occurred in 1.71% of subjects ($n=6$) and was detected in the highest and the second highest quintiles divided according to LDL-C level (Table 1). The frequency of PCSK9 E32K variants in clinical-FH was significantly higher (6.24%, $P < 0.01$) than that in the general population. Further analysis in the relatives of PCSK9 E32K carriers showed that LDL-C concentrations in PCSK9 E32K carriers were higher than those in the general population and lower than those in LDLR mutation heterozygotes (Fig. 1). The PCSK9 E32K variant was associated with a 75% increase in LDL-C (197 mg/dL vs. 113 mg/dL, $P < 0.01$) and a 31% increase in triglyceride (TG, 151 mg/dL vs. 115 mg/dL, $P < 0.01$), and did not influence HDL-C level (Table S1).

3.3. PCSK9 E32K true homozygote and double heterozygote with LDLR mutation

There were 5 rare cases among the PCSK9 E32K carriers in clinical-FH and their relatives as follows: subject I, a true homozygote for the PCSK9 E32K with the highest LDL-C level in her family pedigree at 339 mg/dL (Fig. 2A); subject II, another PCSK9 E32K true homozygote with a modest increase in LDL-C level at 246 mg/dL; subject III, a double heterozygote for c.611G>C (C183S) mutation of LDLR and PCSK9 E32K (age: 1 year, LDL-C: 581 mg/dL and severe cutaneous xanthomatosis, Fig. 2C); subject IV, a double heterozygote for c.939C>A (C292X) mutation of LDLR and PCSK9 E32K (age: 30 years, LDL-C: 425 mg/dL and severe tendon xanthomatosis); subject V, a double heterozygote for LDLR K790X and PCSK9 E32K (age: 2 years, LDL-C: 248 mg/dL and severe cutaneous xanthomatosis, Fig. 2D). No mutations in LDLR were detected in PCSK9 E32K carriers except for the 3 double heterozygotes described above.

3.4. Analysis of circulating PCSK9 levels in PCSK9 E32K carriers and LDLR mutation heterozygotes

Plasma PCSK9 levels in the PCSK9 E32K heterozygotes were significantly higher than those in controls (349 ± 90 ng/mL vs. 266 ± 112 ng/mL, $P < 0.05$), and those in PCSK9 E32K true homozygotes (363 ng/mL) were similar to those in heterozygotes. Strong positive correlations were observed between PCSK9 and LDL-C levels in both the PCSK9 E32K heterozygotes ($r=0.69$, $P < 0.01$) and in control subjects ($r=0.64$, $P < 0.01$, Fig. 3A). Further, the slope of the regression curve between plasma PCSK9 and LDL-C in PCSK9 E32K heterozygotes ($y=0.383x+54.1$) was far steeper than that in controls ($y=0.186x+61.6$). Consequently, relative LDL-C levels were 1.47-fold higher in PCSK9 E32K heterozygotes and 2.10-fold higher in true homozygotes than in controls with comparable cir-

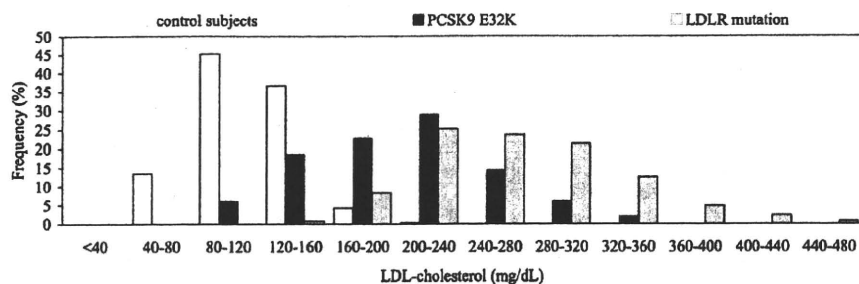


Fig. 1. Plasma LDL-C distribution in control subjects, PCSK9 E32K carriers and LDLR mutation heterozygotes. Bars show the percentage of subjects in each group.

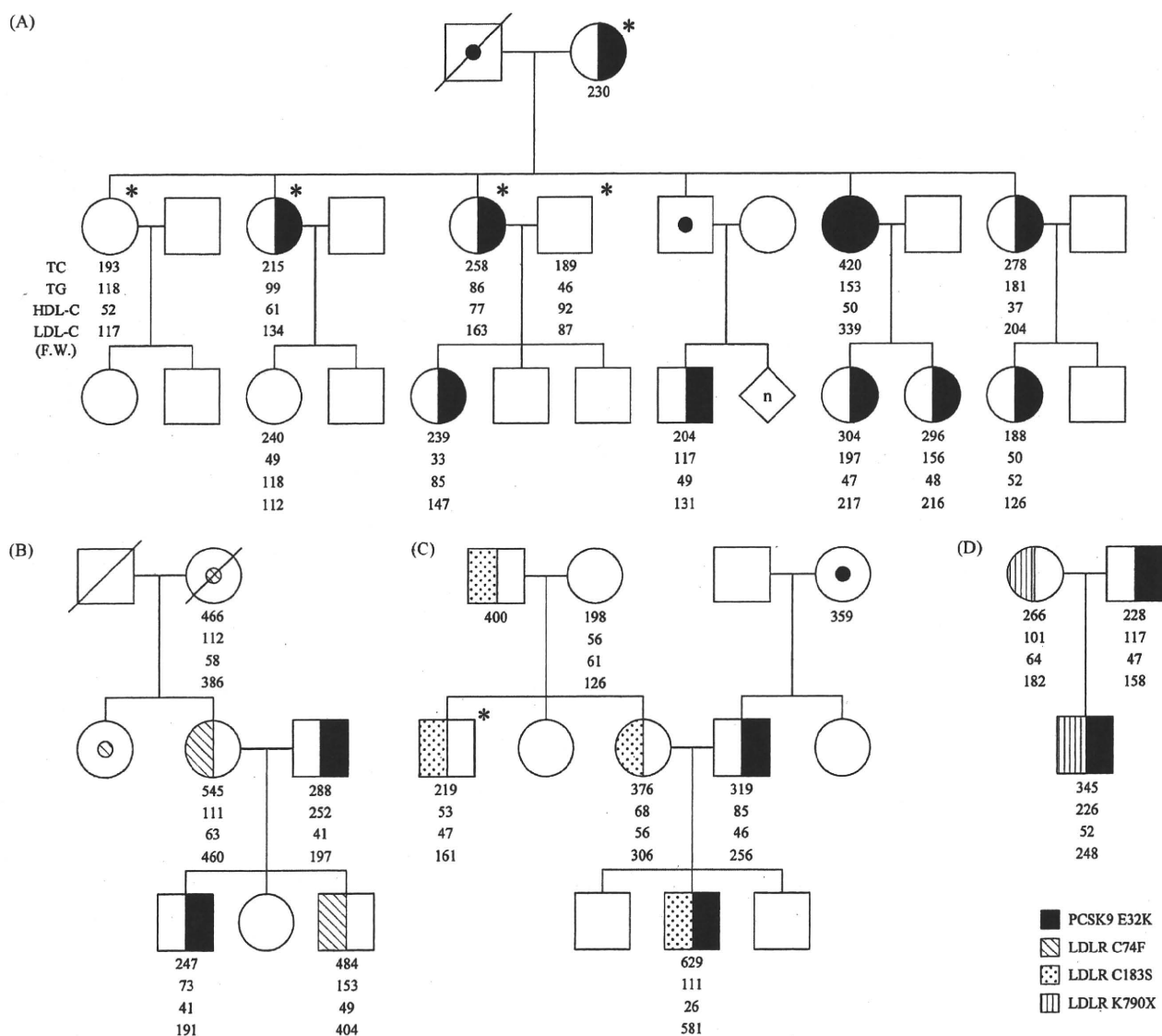


Fig. 2. Pedigrees of gain-of-function PCSK9 mutation families caused by the PCSK9 E32K. (A) Pedigree of subject with true homozygous PCSK9 E32K mutation. (B) Pedigree affected by a single mutation of PCSK9 E32K or LDLR C74F in each subject. (C) Family with a double heterozygote of PCSK9 E32K and LDLR C183S mutations. (D) Pedigree of a double heterozygote with PCSK9 E32K and LDLR K790X mutations. Relatives of another PCSK9 E32K true homozygote and a double heterozygote with PCSK9 E32K and LDLR C292X mutations did not participate in this study. Half-shaded symbols indicate carriers of a single mutation of PCSK9 or LDLR and filled symbol indicates true homozygote. Plasma TC, TG, HDL-C and LDL-C values (mg/dL) are shown below each symbol. Asterisks indicate the subjects treated with lipid-lowering drugs at the time of the study. Hatched lines represent deceased family members. Diamond symbols labelled "n" indicate number and sex of individuals unknown.