



Title	家族性高コレステロール血症の遺伝子変異と病態の多様性に関する研究
Author(s)	太田, 直孝
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/77477
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

家族性高コレステロール血症の遺伝子変異と病態の多様性
に関する研究

2020 年

太田 直孝

略語一覽

VLDL	: very low density lipoprotein
IDL	: intermediate density lipoprotein
LDL	: low density lipoprotein
HDL	: high density lipoprotein
ApoB-100	: apolipoprotein B-100
HTGL	: hepatic triglyceride lipase
CETP	: cholesterol ester transfer protein
LDL-C	: low density lipoprotein cholesterol
HDL-C	: high density lipoprotein cholesterol
TC	: total cholesterol
ATT	: achilles tendon thickening
FH	: familial hypercholesterolemia
ARH	: autosomal recessive hypercholesterolemia
LDLR	: low density lipoprotein receptor
PCSK9	: proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
LDLRAP1	: low density lipoprotein receptor adapter protein 1
IDOL	: inducible degrader of low density lipoprotein receptor
MYLIP	: myosin regulatory light chain interacting protein
STAP1	: signal transducing adaptor family member 1
SREBP1	: sterol regulatory element binding protein 1
CAD	: coronary artery disease
ACS	: acute coronary syndrome
VUS	: variant of unknown significance
MEDPED	: make early diagnosis to prevent early death
DLCN	: dutch lipid clinic network
ACMG	: american college of medical genetics and genomics
AMG	: association of molecular pathology
AS	: aortic stenosis
SVAS	: supraaortic stenosis
ApoE	: apolipoprotein E
CD68	: cluster of differentiation 68

目次

緒論	3
本論	7
第1章 日本人 HeFH の LDLR および PCSK9 バリエント・変異の評価	7
第1節 LDLR および PCSK9 遺伝子におけるバリエント・変異の臨床的意義について	9
1 項 日本人 HeFH における LDLR および PCSK9 バリエント・変異の分布 について	9
2 項 LDLR および PCSK9 遺伝子の病的変異と FH の臨床的特徴との関連について	13
3 項 頻度の高い5つの LDLR 病的変異が FH の病態に及ぼす影響について	14
4 項 LDLR および PCSK9 病的変異が CAD の発症年齢に及ぼす影響について	16
第2節 HeFH 患者の病態における PCSK9 Val4Ile バリエントの役割について	17
1 項 HeFH 患者における PCSK9 バリエント・変異の頻度	17
2 項 PCSK9 バリエントおよび病的変異の血清脂質値への影響	19
3 項 PCSK9 バリエントおよび病的変異の FH の病態との関連性について	21
4 項 PCSK9 と LDLR のダブルヘテロ変異の認められた患者の臨床経過について	23
考察1	25
第2章 FH における大動脈弁狭窄 (AS) の病変の特徴について	28
1 項 手術時の年齢と臨床所見	29
2 項 FH および非 FH における AS 病変の比較	31
考察2	35
総括	37
実験の部	38
謝辞	46
参考文献	47

緒論

脂質異常症は、血中のコレステロールや中性脂肪が異常値を示す病態を言う。LDLコレステロール(LDL-C)が140mg/dL以上の高LDLコレステロール血症、HDLコレステロール(HDL-C)が40mg/dL未満の低HDLコレステロール血症、中性脂肪(TG)が150mg/dL以上の高トリグリセライド血症 のいずれかで診断される。従来は高脂血症と呼ばれていたが、LDL-C(悪玉コレステロール)やTGが増加すると動脈硬化を引き起こし、心血管疾患リスクが上昇する。一方で、HDL-C(善玉コレステロール)は動脈硬化の進展抑制に関わっており、減少すると心血管疾患のリスクが上昇するため、「脂質異常症」に改名された。脂質異常症は、主に遺伝子異常を原因とする原発性脂質異常症と他の要因によって生じる続発性脂質異常症に分けられている。原発性脂質異常症の中で、頻度の高い脂質異常症に家族性高コレステロール血症(Familial hypercholesterolemia; FH)がある。FHは遺伝性疾患であり、優性遺伝形式をとる1)。

FHは、LDL受容体またはその関連遺伝子の変異により、1つの対立遺伝子の変異によるものをFHヘテロ接合体(HeFH)、2つの対立遺伝子の変異によるものをFHホモ接合体(HoFH)と定義される。HeFHは、わが国においては200-500人に1人と高頻度であり、30万人以上の患者がいると推定されている。HeFHのLDL-C値は平均 248 ± 67 mg/dLと報告されている2)。HoFHは、16~100万人に1人の頻度であり、希少疾患として難病に指定されている。HoFHのLDL-C値は、平均 582 ± 132 mg/dLと報告され、極めて高値を示す2)。

FHではLDL受容体やその機能に関連した遺伝子の異常によりLDLの肝細胞への取り込みが障害を生じることから、血中LDL-C値やTC値が増加する。FHは幼少期より高LDL-C血症を示すことから、心筋梗塞などの冠動脈疾患(Coronary Artery Disease; CAD)のリスクが非常に高いことが知られている2)3)。

FHの動脈硬化発症のメカニズムについて、モデル動物であるWHHLウサギ(Watanabe Heritable Hyperlipidemic rabbit)が日本で発見され、動脈硬化の発症機序の解析に大きく寄与してきた。このWHHLウサギは、LDL受容体の12塩基対の欠失変異であることが明らかにされ4)、LDL受容体のLDL取り込み能の低下5)、血中でのLDLの滞留による変性や血管内皮細胞の傷害が生じ、酸化LDLを取り込んだマクロファージのM ϕ 集積により動脈硬化が進展すると考えられている。FHに特徴的に見られる黄色腫についてもM ϕ が酸化LDLを取り込み、泡沫化した細胞の蓄積により生じていると考えられている。

HeFHは、未治療の状態では、男性で30歳代から、女性では40歳代から高頻度にCADを発症する2)。欧米では、未治療の場合に20~100倍にCADの発症リスクが上昇するとの報告もある6)7)。HoFHにおいては、原発性高脂血症に関する調査研究によると、全例でアキレス腱肥厚を認め、73%でCADの合併を認めたと報告されている2)。また、HoFHは、未治療では30歳まで生きられないとされている。

LDL-C値とCAD発症の関係について、近年、累積LDL-C量(mg/dL・Y)という概念が提唱

されている8)。累積LDL-C閾値（LDL-C×年数）が 約6,000 mg/dL・Y）に到達した場合に、CADが発症するという概念で、生下時より高LDL-C値を示すHeFHは35年、HoFHは12.5年で到達すると計算され、非FH患者に比べてCAD発症に至る年齢が若いことの説明とされている（Fig1）。また、動脈硬化の危険因子とされている、喫煙、高血圧、糖尿病、高TG血症、低HDL-C血症、高Lp(a)血症が、この閾値そのものを低下させると言われている。本図から、HeFHおよびHoFHは、できる限り早期に診断して、LDL-C値を厳格にコントロールすること、さらには動脈硬化のリスクを厳格にコントロールすることが重要であることがわかる。

日本人FHの診断および治療に関するガイドラインが（2017）によると9）。HeFHの診断には、①高LDL-C血症（未治療時のLDL-C 180mg/dL以上）②腱黄色腫 ③2親等以内にFHの親族、早発性（男性で55歳未満、女性で65歳未満）発症のCAD家族歴の 3つの項目のうち2項目以上が当てはまる場合にFHと診断する（Table 1）。諸外国でもガイドラインに同様の診断基準を定めている8)10)。FHについては、これまで、全世界において必ずしも適切に診断がなされていないと言われており、Nordestgaardらにより、世界各国のFHの診断率が報告されている3)。北欧諸国で高値である一方、日本や米国では1%未満であった。また、急性心筋梗塞などの緊急対応が必要な冠動脈疾患である急性冠症候群（acute coronary syndrome; ACS）を対象にFHの有病率を検討した報告では、FHの有病率はACS患者の方が一般母集団よりも5倍高かったと報告されている11)。したがって、CADの発症率を減少させるためには、我が国においてもFHの診断率を向上させることが課題である。

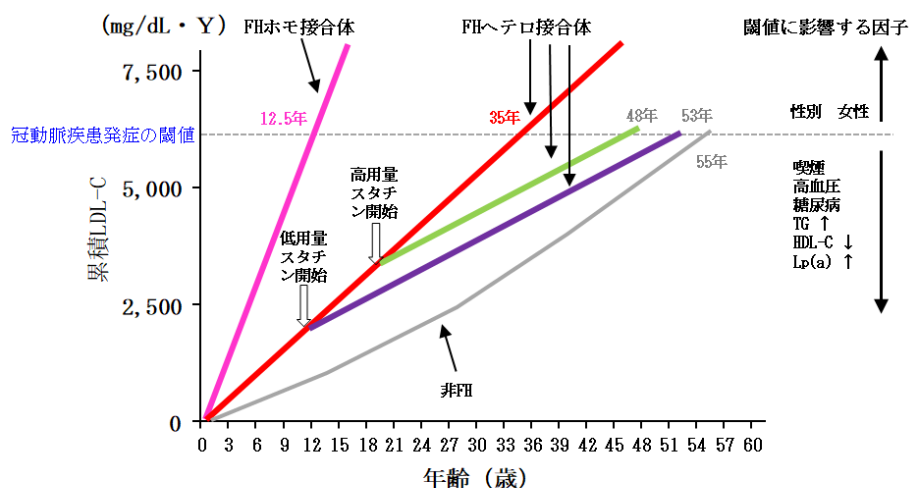


Fig1 FH患者における累積LDL-Cと冠動脈疾患の発症
累積LDL-CとFH患者および非FH患者の冠動脈疾患発症年齢の違いを示している。
（FHホモ接合体；12.5年、FHヘテロ接合体；35年、非FH；55年）

Nordestgaard BG et al. Eur Heart J 2013; 34: 3478-3490 一部改変。

Table1 成人（15 歳以上）FH ヘテロ接合体診断基準

1. 高 LDL-C 血症（未治療時の LDL-C 値 180 mg/dL 以上）
2. 腱黄色腫（手背、肘、膝等またはアキレス腱肥厚）あるいは皮膚結節性黄色腫
3. FH あるいは早発性冠動脈疾患の家族歴（2 親等以内）

- ・ 続発性高脂血症を除外した上で診断する。
- ・ 2項目以上でFHと診断する。FHヘテロ接合体疑いは遺伝子検査による診断が望ましい。
- ・ 皮膚結節性黄色腫に眼瞼黄色腫は含まない。
- ・ アキレス腱肥厚は X 線撮影により 9 mm 以上にて診断する。
- ・ LDL-C が 250 mg/dL 以上の場合、FH を強く疑う。
- ・ すでに薬物治療中の場合、治療のきっかけとなった脂質値を参考にする。
- ・ 早発性冠動脈疾患は男性 55 歳未満、女性 65 歳未満と定義する。
- ・ FH と診断した場合、家族についても調べるのが望ましい。
- ・ この診断基準はホモ接合体にも当てはまる。

文献9)より改変

FHは、極めてCADリスクの高い遺伝病であり、スタチン系薬剤治療により予後が改善することも知られている12)。

HeFHにおいては、一次予防では、LDL-C管理目標値を100mg/dL未満とし、目標値に到達しない場合は未治療時の50%未満、二次予防患者においては、70 mg/dL未満とされている。スタチン系薬剤が第一選択薬とされているが、実際にはスタチン系薬剤単独では最大投与を行っても、管理目標値を達することは困難なことが多く、作用機序が異なる他の薬剤のエゼチミブやレジンなどが用いられる（F1g. 2）。

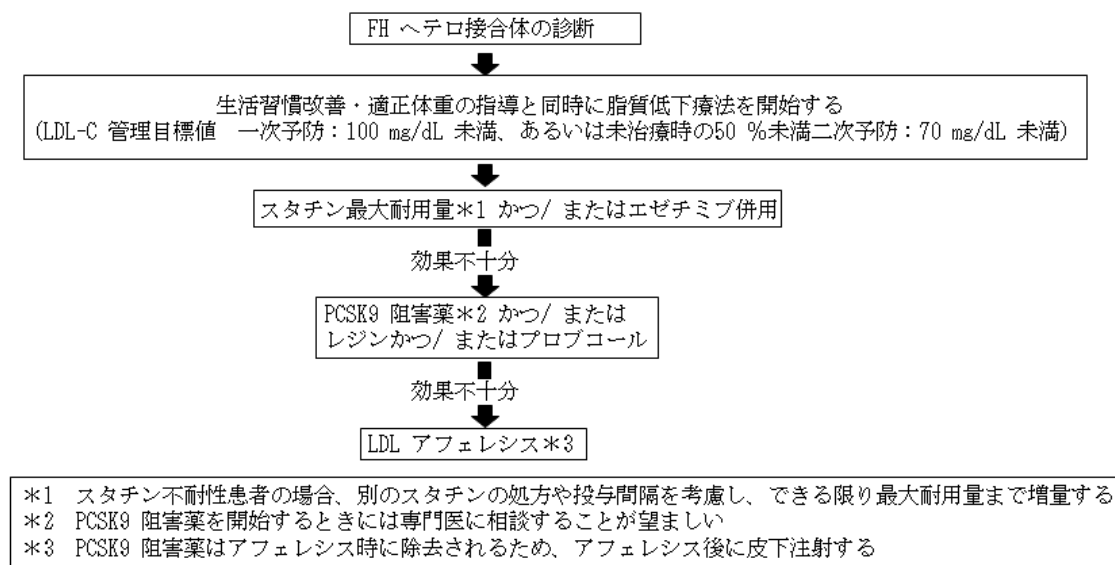


Fig2 ヘテロFH接合体治療のフローチャート

文献9)より改変

一方、HoFHの場合は、LDL-C管理目標値は一次予防では100 mg/dL未満、二次予防では 70 mg/dL未満とされている。薬物療法では、スタチン系薬剤やPCSK9阻害薬は、主要な作用機序が LDL 受容体の発現の増強であるため、LDL-C値の低下効果は限られている13)14)。

近年、PCSK9を標的としたPCSK9阻害薬が承認された。PCSK9とLDL受容体の結合を阻害して、LDL受容体の分解を抑え、血中LDLの肝細胞内への取り込みを促進する機序により、強力なLDL-C値低下作用を持つ。PCSK9阻害薬はこれまで薬物治療によるコントロールが困難であった症例にも効果があることが報告されている。HoFH 106例を対象とし、エボロクマブの効果を検討したTAUSSIG試験では、*LDLR* 機能欠損型変異群では効果がなく、*LDLR*機能低下型（*LDLR* 活性が20%以下）変異群では、LDL-Cのベースラインからの低下率が20%、*LDLR* と*PCSK9* のダブルヘテロ変異群では65%であったと報告された16)。一方、HeFHを対象にエボロクマブの効果を検討したRUTHERFORD-2試験では、早期に約60%低下したことが報告されている17)。

適切な治療を開始するには、遺伝子解析による診断が極めて重要な位置を占めるといえる。FHの遺伝子解析においては、これまでに多くの変異やバリエーションが検出されているが、バリエーションや変異については人種差あるいは地域差が存在しており、日本人FHに対して登録されたデータと臨床的な意義がどのように結びつけられているのかを確認しなければならないと考える。

FHは、CADだけでなく動脈硬化性疾患として、下肢動脈閉塞症や大動脈弁狭窄症（aortic stenosis: AS）などを合併することが知られている。HeFHにおいては、56%の患者で腸骨動脈に動脈硬化性病変を示していたと報告されている18)。一方、ASは、大動脈弁の開口部が狭くなり、左心室から大動脈への血流が妨害（閉塞）され、左心室への負担が大きくなる状態である。大動脈弁口の面積が狭くなる原因には、加齢による硬化や石灰化などが原因と考えられている19)20)。HoFHでは、高頻度に合併することが報告されており、その中の多くが大動脈弁上狭窄（supravalvular aortic stenosis: SVAS）も有している。ASの発症機序は、大動脈で見られる動脈硬化の発症・進展機序、すなわち、マクロファージによる酸化LDLの貪食と泡沫化および血管壁への沈着による機序と同様ではないかと考えられているが、LDL-C値の影響や閾値についてなど、明らかではない部分も多く、さらに、大動脈弁に対する詳細な検討はなされていない。また、一般的な加齢性のASとの違いについても明らかになっていないのが現状である21)22)。

そこで本研究では、第1章で、検出したバリエーションをデータベースでどのように分類されているのか確認し、日本人FHにおける臨床的意義について評価を行った。

なお、本研究で用いたバリエーションおよび変異の分類は、データベースでの定義に基づいて、病原性があるかもしくは可能性があるものをそれぞれpathogenicまたはlikely pathogenic、良性（病原性なし）のものをbenign、どちらかまだ明らかになっていないものをVUSとした。さらに、本文中において、病気の原因であるもの、または可能性があるものを変異または病的変異とし、そうでないものはバリエーションとした。

次に第2章で、合併症であるASについて、大動脈弁の病理学的な解析を行い、石灰化や動脈硬化の関与など大動脈弁の病変についてFHおよび非FHの違いについて検討を行った。

本論

第1章 日本人HeFHのLDLRおよびPCSK9バリエーション・変異の評価

FHの原因遺伝子として、現在まで3つの遺伝子の変異が明らかになっている。①LDL受容体 (LDLR) 遺伝子変異 (FH1)、②アポリポタンパクB (APOB) 遺伝子変異 (FH2)、③proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) 遺伝子の機能亢進型 (GOF) 変異 (FH3) である。他に極めて頻度が低いが、ARHの原因遺伝子としてLDL receptor adapter protein 1 (LDLRAP1) が明らかになっている。

1973年に、GoldsteinとBrownらは、HOFHの線維芽細胞のコレステロール代謝を調べることにより、LDL受容体を発見した²³⁾。その後、FHにおいてLDLRの遺伝子変異を発見した。LDL受容体は、分子量16万の糖蛋白である。LDLRは第19番染色体 (p13.1-13.3) に位置し、全長45kbp、18個のエクソンから成る。

FHにおけるLDLR変異の割合は、37～82%と報告されている²⁴⁾。LDLR変異を有するFHでは、その病態の程度やLDLRの機能も様々である。FH Tonami-2と命名されている変異の場合、LDLRのエクソン2と3を含んだ約10kbの大規模欠失変異であるが、この変異を有するFHは、CADの発症も遅いことや、LDL-C値やTC値についても正常値を示していた症例も認められることが報告されている²⁵⁾。一方でc. 2431A> T: p. (Lys811 *) 変異については、LDLR活性が低いことが報告されている²⁶⁾。

APOB 変異は、1986年に、LDLRに対するリガンドであるアポリポ蛋白B遺伝子の変異による familial defective Apolipoprotein (Apo) B-100 (FDB) の報告がなされた²⁷⁾。ApoBの変異は、ApoBとLDL受容体の結合親和性が低下し、LDLR変異と同じFHの病態を呈する。ApoBの変異は、R3500Q、R3500W、R3531Cなどの変異がLDLRとの親和性が低下すると報告されているが、日本人FHでのApoB100変異については、現在のところ報告はない²⁸⁾。

FHの中でLDLR遺伝子、APOB遺伝子のどちらにも異常を認めないフランス人家系における連鎖解析から2003年、Abifadelらにより第3の原因遺伝子としてPCSK9遺伝子が同定された²⁹⁾。PCSK9は、シグナルペプチド、プロドメイン、触媒ドメイン、およびC末端ドメインからなる692アミノ酸のタンパク質をコードする。主にプロドメイン、触媒ドメインまたはC末端ドメインにPCSK9のGOFおよびLOF変異が存在することも報告されている³⁰⁾³¹⁾。PCSK9変異はその機能変異への影響から、2種類に分けられる。すなわち機能低下型 (喪失型, loss-of-function: LOF) と機能亢進型 (獲得型, gain-of-function: GOF) が報告されている²⁹⁾³²⁾。PCSK9の機能亢進型 (GOF) 変異は、LDLRの分解を促進することにより血中LDL-C値が上昇する。機能低下型 (LOF) 変異では血中LDL-C値を低下することからCADのリスクの低下と関連していることが報告された³³⁾³⁴⁾。FHの原因となる

のはGOF変異である。日本人FH患者においては、*PCSK9* E32K変異が検出されており、この変異を有するFHのLDL-C値はLDLR変異を有するFHと非FHの中間の値を示していたことが報告された34)。日本人FHにおける原因遺伝子については、*LDLR*変異の頻度が最も高く、次いで*PCSK9*変異の頻度が高い35) 36)。また、*PCSK9*の変異の頻度は、欧米の頻度(0～1.5%程度)に比べて高いことが知られている。

LDL受容体蛋白 (LDRAP1)は、2001年、Garciaらによって同定され、autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH)と呼ばれるようになった。1991年に、斯波らは、著明な高コレステロール血症、巨大な多発性黄色腫を示し、HOFHと同様の症状を示した症例を報告し37) 38)、2003年に*LDLRAP1*変異であったことを明らかにした39)。*LDLRAP1*は、LDL受容体が細胞内に取り込まれる段階でアダプター蛋白の働きをしており、その機能が完全に欠損するとLDL受容体が細胞内に取り込まれず、HOFHと同様の病態を示す。

近年、遺伝子解析により、これまでHOFHと診断されていた中には、遺伝子変異により、3つにわけられることが示された。*LDLR*の同じ変異を有するtrue homozygote、別の2つの変異を有するcompound heterozygoteやLDLR変異と*PCSK9*変異の異なる遺伝子の変異を有していたdouble heterozygoteである。これらの遺伝子変異の種類により、治療の反応性が異なり、治療法の選択が異なることが明らかにされてきた。さらにHeFHにおいては、病態は多様性があり、LDL-C値・アキレス腱肥厚の程度・CADの発症や重症度などが遺伝子の種類や変異の種類によって異なっている40) 41)。また、*PCSK9*は、欧米人に比べて日本人FHでの頻度が高いことが報告されているが42)、日本人FHにおける*PCSK9*バリエーションや変異とFHの病態については、十分に理解されていないのが現状である。FHの遺伝子解析は、単にFHと診断を下すだけでなく、遺伝子変異の種類により、予後予測、そして治療法選択まで応用が可能であると考えられ、そのためには、日本人のデータを積み上げ、解析をする必要がある。本研究では、日本人HeFHの*LDLR*および*PCSK9*バリエーションおよび変異について、臨床情報との関連を調べ臨床的意義について検討し、病態に及ぼす影響を調べ、臨床への応用を目的として検討した。

1節 *LDLR*および*PCSK9*遺伝子におけるバリエント・変異の臨床的意義について

1項 日本人HeFHにおける*LDLR*および*PCSK9*バリエント・変異の分布について

遺伝子のバリエントおよび変異における種類や頻度は、人種差や地域差が存在する。日本人におけるFH患者の遺伝子変異とその臨床的特徴を明らかにするため、臨床診断によりHeFHと診断された患者における*LDLR*および*PCSK9*のバリエントおよび変異の種類や頻度について調べた。801人のHeFH患者を対象として、*LDLR* 18エクソン、*PCSK9* 12エクソンについて、全エクソンおよびエクソン/イントロン境界領域について塩基配列を解析した。*LDLR*では、HeFH発端者 (n=650) の57% で137種類のバリエントおよび変異を検出した。これらのうち92個は、ACMG / AMPガイドラインで、pathogenicまたはlikely pathogenicと登録され、44個はVUS、1つはbenignと登録されていた (Fig. 1-1)。本研究においては、pathogenicおよびlikely pathogenicを病的変異と定義した。その結果、臨床的意義のある病的変異は全体 (n=650) の46%を占めていた。病的変異の認められた遺伝子上の位置は、これまでの報告ではエクソン4に多く集積されていたが43)、今回の結果ではエクソン4と10に集積しており、エクソン4に最も多く、次にエクソン10に集積していた。

*LDLR*の頻度の高い病的変異としてc. 1845 + 2T> C (n = 27; 7.5%)、c. 1012T> A : p. (Cys338Ser) (n = 23; 6.4%)、c. 1297G> C : p. (Asp433His) (n = 20; 5.5%)、c. 1702C> G : p. (Leu568Val) (n = 19; 5.2%)、c. 2431A> T : p. (Lys811*) (n = 21; 5.8%) の5つを検出した (Fig. 1-3)。

*PCSK9*では、21種類のvariantを検出した。これらのバリエントはACMG / AMPガイドラインで、4つのバリエントはpathogenicまたはlikely pathogenicと登録され、10のバリエントはVUS、7つのバリエントはbenignと登録されていた (Fig. 1-2, Table 1-1)。*PCSK9*の病的変異は、FH発端者の7.8% (n = 51) で検出された。これらの中で、頻度の高い変異として、以下の4種類を認めた。c. 94G> A : p. (Glu32Lys) (n = 45; 6.9%)、c. 385G> A : p. (Asp129Asn) (n = 1; 0.15%)、c. 644G> A : p. (Arg215His) (n = 1; 0.15%)、c. 1486C> T : p. (Arg496Trp) (n = 4; 0.61%)。これら4つの変異については、機能解析によって機能亢進型変異であることが報告されている44) 45) 46)。よって、本研究では、4つの変異を病的変異と定義した。

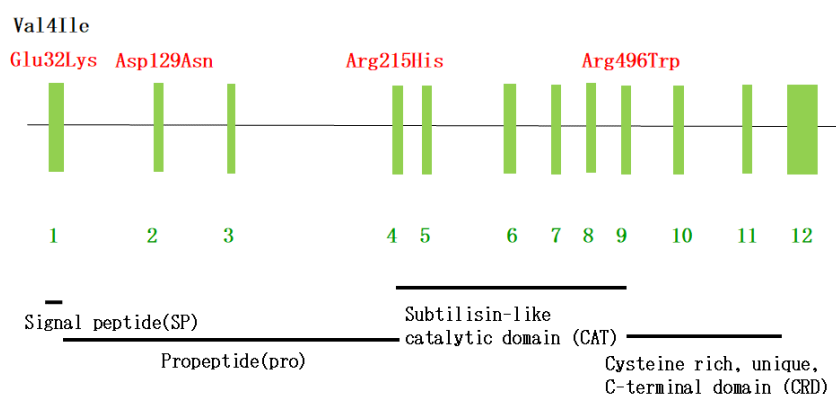


Fig.1-2 location of nonsynonymous variants in *PCSK9* gene detected in Japanese heterozygous FH patients. Point mutations are indicated by red (pathogenic variants).

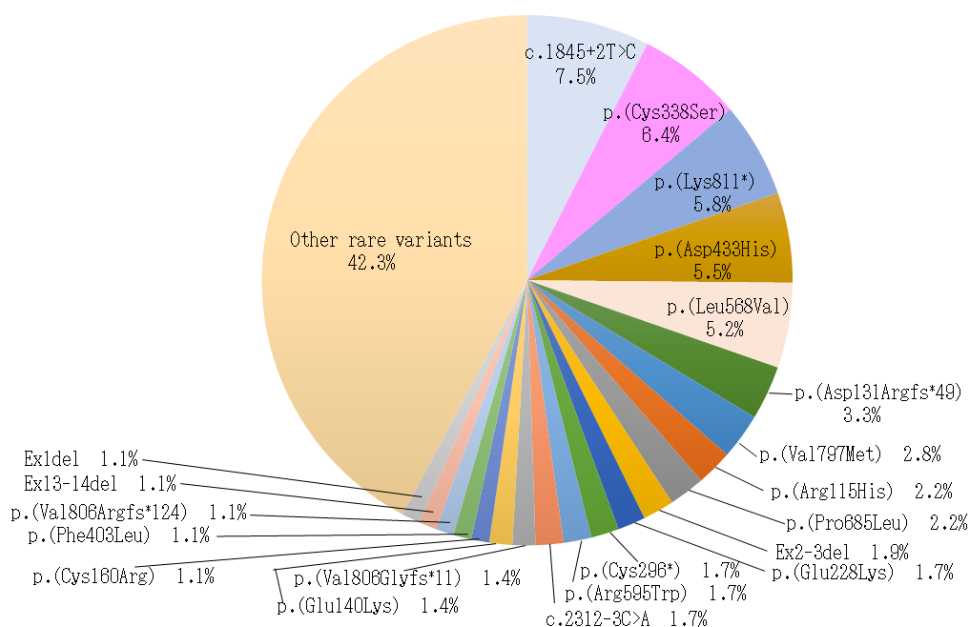


Fig.1-3 Distribution of variants in the LDLR gene in unrelated Japanese heterozygous FH patients. The frequency of each variant was calculated as the ratio of the number of each variant to the total number of LDLR variants (n=362) in unrelated patients

Table 1-1 The variants/mutations detected in the *PCSK3* gene in both unrelated HeFH patients and the general population in Japan and East Asia

Exon No.	Genomic Location (Chr1)	Nucleotide change	Effect of protein	No of patient families	Risk Total No of allele counts in FH	Allele Frequency in FH	Allele Frequency in Japan or East Asia (HGVD/tommo/ExAC-EA) *	ClinVar	rs number	Variant rating according to ACMG
1	55039347	c.102>A	p.V41	9	9	1300	0.007	0.013/0.014**/0.004	N/A	rs18665805 Benign
1	55039300	c.63_64ins CTG	p.L21_221insL94	86	96	1300	0.074	0.098**/-/0.090	Benign/Likely Benign	rs35574093 Benign
1	55039391	c.94C>A	p.E32K	53	45	1300	0.035	0.008***/0.011***/0.002***	Conflicting interpretations of pathogenicity	rs564427867 pathogenic
1	55039395	c.158C>T	p.A58V	94	86	1300	0.074	0.141***/0.134***/0.230***	Benign/Likely Benign	rs11583600 Benign
2	55043988	c.258C>A	p.E98K	1	1	1300	0.001	-/-/0.0002	N/A	rs774506287 uncertain significance
2	55043912	c.277C>T	p.R93C	5	5	1300	0.004	0.007/0.003/0.008	Benign	rs151193003 Benign
2	55044020	c.395C>A	p.D129N	1	1	1300	0.001	-/-/-/-	Conflicting interpretations of pathogenicity	rs779798291 Likely pathogenic
2	55044031	c.396C>C	p.E132D	1	1	1300	0.001	-/0.0001/-	N/A	uncertain significance
3	55046626	c.509C>T	p.A168V	2	2	1300	0.002	-/0.0006/-	N/A	rs770592607 uncertain significance
4	55052398	c.644C>A	p.R215H	1	1	1300	0.001	-/0.0001/-	Conflicting interpretations of pathogenicity	rs794728683 Likely pathogenic
5	55052773	c.737C>A	p.G263S	6	6	1300	0.005	0.008/0.007/0.0002***	N/A	rs200146448 Benign
5	55052783	c.791C>T	p.T264I	6	6	1300	0.005	0.005/0.006/0.002**	N/A	rs201789341 Benign
8	55053125	c.1270G>G	p.L424V	6	5	1300	0.004	0.003/0.003/0.001	N/A	rs753250273 Benign
9	55053576	c.1432C>A	p.A478T	1	1	1300	0.001	-/-/0.0007	N/A	rs375582398 uncertain significance
9	55058630	c.1486C>T	p.R496W	4	4	1300	0.003	-/-/-	Conflicting interpretations of pathogenicity	rs374603772 Likely pathogenic
10	55058492	c.1510C>T	p.G504W	1	1	1300	0.001	-/0.0001/-	N/A	uncertain significance
12	55063391	c.1886C>A	p.G629D	1	1	1300	0.001	-/0.0004/-	N/A	uncertain significance
12	55063435	c.1980C>A	p.Y644I	7	6	1300	0.005	0.003/0.004/0.0002	N/A	rs143291799 uncertain significance
12	55063450	c.1945C>A	p.A649T	1	1	1300	0.001	-/-/-	N/A	uncertain significance
12	55063509	c.2004C>A	p.S668R	1	1	1300	0.001	0.0004/0.0006/0.0003	Uncertain Significance	rs762298323 uncertain significance
12	55063550	c.2045C>A	p.R632Q	1	1	1300	0.001	-/-/-	N/A	rs75946245 uncertain significance

p<0.05, p<0.001vs allele frequency in FH based on Fisher's exact test.

N/A: not applicable.

Allele frequency in the general population in Japan and East Asia is shown based on the Japanese Human Genetic Variation Database, Japanese genome variation database (ToMMo_3.5KJPN), and ExAC-East Asian (ExAC-EAS).

The c.83_85dup.p.(Leu28dup) and c.158C>T.p.(Ala58Val) variants were in linkage disequilibrium with each other, resulting in 10 homozygous and 76 heterozygous variants in these two genes.

2項 LDLRおよびPCSK9遺伝子の病的変異とFHの臨床的特徴との関連について

LDLRおよびPCSK9の病的変異の臨床的特徴を調べる目的で、FHに特徴的な所見であるLDL-C値、CAD発症率、アキレス腱肥厚(Achilles tendon thickness; ATT)について比較を行なった。LDLRの病的変異またはVUSを有していた患者群およびPCSK9の病的変異を有していた患者群、そしてLDLR / PCSK9のバリエーションや病的変異を有さない患者群 (LDLR / PCSK9 (-/-) 群) において20歳以上を対象として、各群間の臨床的特徴を比較した (Table 1-2)。LDLR病的変異を有する患者群のLDL-C値は、LDLR / PCSK9 (-/-) 群に比べて優位に高値を示し (Tukey-Kramer test, $p < 0.0001$)、PCSK9の病的変異を有していた患者群に比べても優位に高値を示していた (Tukey-Kramer test, $p < 0.0001$)。ATT肥厚の有無の頻度については、LDLR病的変異を有する患者群でLDLR / PCSK9 (-/-) 群やPCSK9の病的変異を有していた患者群に比べて優位に高かった (Fisher's exact test, Bonferroni補正, $p < 0.001$)。しかし、各患者群間においてCADの発症率に有意差は認められなかった。また、LDLRのVUS (データベース上では病的な意義が明らかになっていないもの) を有していた患者においては、有意差を認めなかったが、LDLR / PCSK9 (-/-) 群やPCSK9の病的変異を有していた患者群に比べて、LDL-C値は高値傾向を示していた。本研究結果においては、病態への関与が疑われる結果であったことから、日本人HeFHにおいて詳細な検討を行っていく必要があると考える。

Table 1-2 Clinical characteristics in HeFH patients ≥ 20 years according to variants in the LDLR or PCSK9 genes

	Non-carriers of LDLR/PCSK9 rare variants	Carriers of LDLR pathogenic variants	Carriers of LDLR VUS	Carriers of PCSK9 pathogenic variants	p-value ^a
N	256	349	64	55	
Age at last follow-up (years)	58 \pm 15	52 \pm 18	53 \pm 18	58 \pm 15	<0.0001
Male (%)	52	50	41	53	0.4480
Total cholesterol (mg/dL)	297 \pm 65	351 \pm 80	334 \pm 72	284 \pm 41	<0.0001
Triglycerides (mg/dL)	134 (95-198)	101 (71-151)	123 (78-201)	155 (100-190)	<0.0001
HDL-cholesterol (mg/dL)	57 \pm 17	53 \pm 15	54 \pm 14	55 \pm 15	0.0689
LDL-cholesterol (mg/dL)	207 \pm 50	275 \pm 73	251 \pm 63	201 \pm 42	<0.0001
Prevalence of diabetes mellitus (%)	18	8	9	4	0.0003
Prevalence of hypertension (%)	14	9	6	11	0.1592
Prevalence of ATT (%)	65	82	55	44	<0.0001
Smoking (past or current) (%)	44	36	42	36	0.3032
Prevalence of CAD (%)	38	31	34	18	0.0363

Values are the mean \pm SD or median (interquartile range). Untreated serum lipid levels are shown.

^ap-values were calculated based on Pearson's Chi-square test for categorical data and based on ANOVA or Kruskal-Wallis test for continuous variables.

ATT: Achilles tendon thickness; CAD: coronary artery disease; VUS: variants of uncertain significance.

3項 頻度の高い5つの*LDLR*病的変異がFHの病態に及ぼす影響について

FHの遺伝子変異とその病態との関連を明らかにする目的で、頻度の高い*LDLR*病的変異5つの変異について、それぞれの患者群の病態を解析した (Table1-3)。これらの病的変異を有する20歳以上の患者の血清脂質値、ATTおよびCADの罹患率について、他の*LDLR*病的変異を有する患者との比較を行った。c. 1845 + 2T> Cおよびc. 1702C> G : p.

(Leu568Val) 変異を有する患者は、LDL-C値が低値、HDL-C値が高値であった。c. 1297G> C : p. (Asp433His) を有する患者のTC値は有意に高値であった。ATT肥厚を有していた割合は、c. 1012T> A : p. (Cys338Ser) を有する患者で有意に高値を示し、c. 1702C> G : p. (Leu568Val) を有する患者では低値を示した。近年、ATT肥厚の増加は、高LDL-C値、HDL-C値の減少、コレステロール排出量の減少、またはFH患者の高血圧の有病率の増加に関連していることが報告されている46)47)。今回、共変量で調整した後では、ATTの有病率とc. 1702C> G : p. (Leu568Val) やc. 1012T> A : p. (Cys338Ser) 変異との関連性は認められなかった。さらに、c. 1845 + 2T> C変異については、受容体活性がない、いわゆる受容体陰性の変異であること48)、c. 1297G> C : p. (Asp433His) 変異は、受容体合成の障害や急速な分解を起こすことと関連していることが報告されている49)。

今回の結果で、ATT肥厚については、高血圧因子の影響を受けていた変異があったため、今後、より多くのサンプルを用いて病態に対する各変異の影響を評価する必要があると考える。

Table 1-3 Effect of 5 frequent variants on clinical phenotype in HeFH patients aged ≥ 20 years harbouring LDLR pathogenic variants

Genotype	No. of subjects	Total cholesterol (mg/dL) ^a	Triglycerides (mg/dL) ^a	HDL-cholesterol (mg/dL) ^a	LDL-cholesterol (mg/dL) ^a	Prevalence of ATT (%) ^b	Prevalence of CAD (%) ^b	Smoking (past/current)(%) ^b	Male (%) ^b	Prevalence of hypertension (%) ^b	Prevalence of diabetes mellitus (%) ^b
c.1845+2T>C											
T/T	316	355 \pm 80	105 (73-156)	53 \pm 15	278 \pm 73	82	32	36	50	9	9
T/C	33	317 \pm 74	76 (56-122)	52 \pm 14	247 \pm 71	73	18	42	52	9	0
<i>p</i> -value		0.0214	0.0628	0.6855	0.0459	0.2202	0.1144	0.5557	1	1	0.0918
p.Cys338Ser											
T/T	319	350 \pm 80	101 (70-155)	53 \pm 15	274 \pm 73	80	30	35	49	8	8
T/A	30	357 \pm 85	108 (73-140)	53 \pm 14	283 \pm 80	97	43	45	60	20	13
<i>p</i> -value		0.7369	0.8584	0.9997	0.6195	0.0241	0.1482	0.3172	0.3399	0.0439	0.283
p.Lys811Ter											
T/T	325	350 \pm 80	102 (71-151)	53 \pm 15	274 \pm 73	81	30	36	50	9	8
T/C	24	364 \pm 83	98 (78-200)	55 \pm 12	289 \pm 70	91	42	39	50	13	4
<i>p</i> -value		0.5581	0.661	0.6971	0.503	0.2736	0.2566	0.8229	1	0.4724	0.7073
p.Asp433His											
G/G	328	347 \pm 76	100 (70-147)	53 \pm 15	274 \pm 74	82	30	35	49	9	8
G/C	21	401 \pm 124	148 (99-192)	48 \pm 15	295 \pm 65	82	52	56	62	5	10
<i>p</i> -value		0.0117	0.0545	0.2638	0.32	1	0.0481	0.1269	0.3684	0.7068	0.6806
p.Leu568Val											
C/C	332	352 \pm 81	101 (73-152)	52 \pm 15	277 \pm 74	83	32	37	51	9	8
C/G	17	322 \pm 60	108 (64-157)	64 \pm 19	249 \pm 65	57	12	21	41	12	0
<i>p</i> -value		0.2075	0.8855	0.0079	0.1674	0.027	0.1062	0.3936	0.4689	0.6617	0.3798

Values are the mean \pm SD or median (interquartile range). Untreated serum lipid levels are shown.

^a*p*-values were calculated based on unpaired student t-test or Mann-Whitney U test.

^b*p*-values were calculated based on the Fisher's exact test.

ATT: Achilles tendon thickness; CAD: coronary artery disease

4 項 LDLRおよびPCSK9病的変異がCADの発症年齢に及ぼす影響について

各遺伝子の病的変異とCAD発症年齢との関係を調べるために、CADを発症した患者を発症年齢で分類して、LDLRまたはPCSK9の病的変異の割合をFig. 1-4に示した。LDLRの病的変異を有していた患者は、20代でCADを発症した患者の87.5%、30代でCADを発症した患者の60.7%で認められた。20代でCADを発症していた患者については、c. 530C>T: p. (Ser177Leu)、c. 888C>A: p. (Cys296*)、c. 1297G>C: p. (Asp433His)、c. 2054C>T: p. (Pro685Leu)、c. 2389G>A: p. (Val797Met)、c. 2431A>T: p. (Lys811*)、およびエクソン8～10の重複を有していた。LDLR病的変異を有する患者の割合については、CADの発症年齢の増加に伴い有意に減少していた (Cochran-Armitage trend test、 $p = 0.0043$)。FHにおいて、早発性CAD発症には、LDLR病的変異が大きく関わるということが明らかになった。

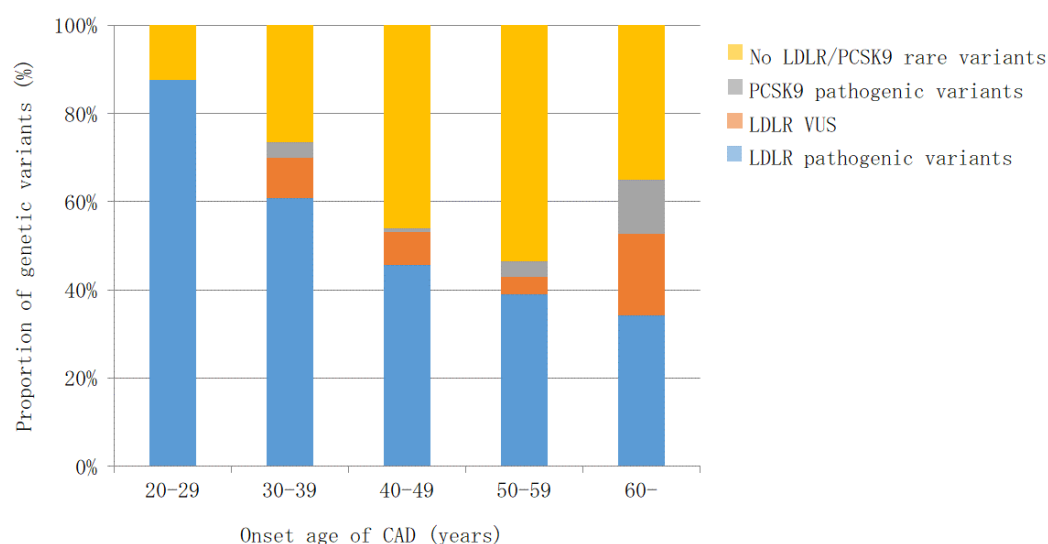


Fig. 1-4 Proportion of variants in the LDLR and PCSK9 genes stratified by the age of CAD onset. The association between LDLR or PCSK9 pathogenic variants and the age of onset of CAD.

さらに性別の違いについては、男性患者の割合はCAD発症年齢の増加に伴って有意に減少していたが (Cochran-Armitage trend test、 $p = 0.0084$)、女性患者の場合、減少していなかった (Cochran-Armitage trend test、 $p = 0.222$)。女性の場合は、エストロゲンによる動脈硬化抑制の働きにより、男性に比べてCADの発症頻度は低く、更年期以降になると次第に男性の頻度に近づいていくことが原因であると考えられた。

2節 HeFH患者の病態におけるPCSK9 Val4Ileバリエントの役割について

1項 HEFH患者におけるPCSK9バリエントおよび病的変異の頻度

HeFH患者(発端者)224名について、PCSK9(12エクソン)の全エクソンおよびエクソン/イントロン境界領域について塩基配列を解析した。PCSK9バリエントおよび病的変異の種類および頻度をTable 1-4に示した。

Table 1-4 PCSK9 variants identified in unrelated heterozygous FH patients

Location	Functional domain	Nucleotide change	Effect of protein	Subjects with each variant	Frequency in subjects	Frequency in Japanese*	rs number	p-value**
Exon								
1	Signal peptide	c.10G>A	p.V4I	14	0.067	0.025	rs186669805	0.0055
1	Signal peptide	c.63_64ins CTG	p.L21_L22insL	18	0.087	0.318	rs72555377	2.1×10^{-8}
1	Pro-domain	c.94G>A	p.E32K	14	0.067	0.011	rs564427867	1.6×10^{-5}
1	Pro-domain	c.158C>T	p.A53V	18	0.087	0.316	rs11583680	2.7×10^{-8}
2	Pro-domain	c.277C>T	p.R93C	1	0.004	0.016	rs151193009	0.23
5	Catalytic	c.787G>A	p.G263S	3	0.014	0.018	rs200146448	0.78
5	Catalytic	c.791C>T	p.T264I	1	0.004	0.010	rs201789841	0.70
8	Catalytic	c.1270A>G	p.I424V	2	0.009	0.019	rs759250273	0.41
9	C-terminal	c.1486C>T	p.R496W	1	0.004	N/A***	rs374603772	N/A***
10	C-terminal	c.1510G>T	p.G504W	1	0.004	N/A***	rs374455190	N/A***
12	C-terminal	c.2004C>A	p.S668R	1	0.004	0.002	rs762298323	1.00

*Based on Japanese genetic variation consortium (<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB>).

**Based on the Fisher's exact test.

***There are no reports in Japanese genetic variation consortium.

PCSK9バリエントおよび病的変異は、11種類検出された。頻度の高かったバリエントまたは病的変異は、4種類認められ、L21_22insL、c.158C>T: p. (Ala53Val)、c.10G>A: p. (Val4Ile)、c.94G>A: p. (Glu32Lys)を検出した。ACMG / AMPガイドラインで分類されている病的変異はc.94G>A: p. (Glu32Lys)のみであった。また、これらは、すべてエクソン1に存在していた。L21_22insLは、PCSK9のシグナルペプチドに存在し、1つのロイシンが余分に挿入されているバリエントであった。L21_22insLとc.158C>T: p. (Ala53Val) バリエントは、連鎖不平衡にあり、最も頻度が高かった(n=18; 8.7%)が、Human Genetic Variation Databaseで示されている一般日本人集団での頻度24%よりも低かった。次に、c.10G>A: p. (Val4Ile) バリエントは、6.3% (n=14)であった。この頻度は一般日本人集団の頻度2.5%よりも高かった。さらにc.94G>A: p. (Glu32Lys)変異も、6.3% (n=14)であった。これは、c.10G>A: p. (Val4Ile) バリエントと同様に一般日本人集団の頻度1.1%よりも高い頻度を示していた。c.10G>A: p. (Val4Ile) バリエントおよびc.94G>A: p. (Glu32Lys) 変異は同じ頻度で認められた。c.94G>A: p. (Glu32Lys)病的変異の頻度は、馬渕らの報告と一致していた50)。本研究で得られた

結果は、これまでに他の国で報告されている病的変異の種類とは異なっていた

(Ser127Arg、Asp129Gly、Phe216Leu、Arg218Ser、Arg357His、D374Y、およびAsp374His) (51) (52)。*PCSK9*バリエントや病的変異の頻度についても、フランス人HeFHにおける*PCSK9*変異の割合、0.7%、オランダ人0.1%とも異なっていた(42) (53)。日本人HeFHの*PCSK9*変異の割合は他の国のFHにおける*PCSK9*変異割合よりも高いことが示された。

さらに、Arg496Trpバリエントについては、本研究において、日本人FHで初めて示した。一方、Arg93CysおよびSer668Argバリエントは機能低下型変異であるが、この機能低下型変異を有していたFH患者は、LDLR変異も有していた。この*PCSK9*の機能低下型変異とLDLR変異を両方有していたFHに関する報告はないが、今回臨床診断でFHと診断されていることから、病態の程度については、*PCSK9*機能低下型変異の影響よりもLDLR変異の影響の方が優位に働いている可能性が示唆された。また、Arg496TrpバリエントおよびGly504Trpバリエントは、稀なバリエントであり、一般日本人母集団においても報告されていない(40) (43)。さらにThr264Ileバリエント、Ile424ValバリエントについてもLDL-C値が高くなるかどうかなどの報告はなされていないため、これらのバリエントにおいては、FHの病態との関連性について、今後、研究を進めていく必要がある。

2項 PCSK9バリエントおよび病的変異の血清脂質値への影響

HeFH患者における、PCSK9バリエントおよび病的変異の特徴を比較するために、それぞれを有するグループの血清脂質値の比較を行った。

PCSK9単独のバリエントあるいは変異を有していた患者群(n=32)の間では、血清脂質値に有意差は認められなかったが、L21_22insL/ c. 158C> T: p. (Ala53Val) バリエントを有していた患者群では、HDL-C値の高値傾向が認められた(P= 0. 055) (Table 1-5)。

L21_22insLバリエントについては、レバノンにおいて、LDLR Cys681X病的変異を有する患者では、L21_22insLバリエントが加わることで血中のLDL-C値が低値傾向を示したと報告されている54)。一方、Pisciottaらは、LDLR Gln474His fs X 63病的変異および同様に停止コドンの場所が変更されるCys681X病的変異を有していた患者において、L21_22insLバリエントが加わった患者とそうでない患者との比較で、病態に違いは見られなかったと報告している55)。また、白人一般母集団による報告では、L21_22insLバリエントを有していた群では、LDL-C値が低く、HDL-C値が高い傾向を示していた56)。一方、21_22insL/ c. 158C> L21_22ins2Lのようなロイシンが2つ挿入されたバリエントでは、低TC値、高LDL-C値と関連しているとの報告がある57)。以上のことから、L21_22insLのようなロイシンが1つ挿入されたバリエントについては、LDL-C値に対して様々な報告があり、どのような作用があるかの結論はまだ出ていないと言える。

次に、LDLR変異に加えてPCSK9バリエントおよび病的変異を有していた患者群の間では、c. 10G> A: p. (Val14Ile) バリエントを有していた患者群では、L21_22insL/ c. 158C> T: p. (Ala53Val) バリエントを有していた患者群に比べてTC値、LDL-C値は高値傾向が認められた(Table1-5)。

Table 1-5 Effect of *PCSK9* Val41Ile, L21_22insL/Ala53Val, or Glu32Lys variation on untreated serum lipids patients levels in heterozygous FH with or without *LDLR* mutations

Genotype	No. of subjects	TC (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)
Patients with <i>PCSK9</i> variants and without <i>LDLR</i> mutations					
Val41Ile					
wild type	113	311 ± 68	169 ± 125	56 ± 17	215 ± 56
mut type	7	289 ± 61	111 ± 39	58 ± 9	209 ± 58
p-value*		0.41	0.23	0.72	0.78
L21_22insL/Ala53Val					
wild type	109	312 ± 70	161 ± 115	55 ± 16	217 ± 57
mut type	11	291 ± 38	200 ± 178	66 ± 13	189 ± 35
p-value*		0.33	0.37	0.055	0.18
Glu32Lys					
wild type	106	310 ± 70	167 ± 125	55 ± 16	215 ± 57
mut type	14	306 ± 52	148 ± 98	61 ± 15	216 ± 49
p-value*		0.85	0.61	0.22	0.96
Patients with both <i>PCSK9</i> variants and <i>LDLR</i> mutations					
Val41Ile					
wild type	139	335 ± 67	125 ± 182	52 ± 14	254 ± 61
mut type	10	378 ± 100	141 ± 96	58 ± 15	298 ± 98
p-value*		0.078	0.82	0.27	0.081
L21_22insL/Ala53Val					
wild type	135	340 ± 70	128 ± 185	52 ± 14	258 ± 64
mut type	14	318 ± 75	106 ± 67	53 ± 11	245 ± 71
p-value*		0.32	0.71	0.82	0.56

TC, total cholesterol; TG, triglyceride

Sequencing variations are denoted by the chromosomal position according to NCBI build 38 of the human genome.

All values are mean ± SD.

*Based on the Linear regression test.

3項 PCSK9バリエントおよび病的変異のFHの病態との関連性について

各PCSK9バリエントおよび病的変異とATTおよびCADの発症率との関連性を調べた。PCSK9バリエントまたは病的変異を単独で有していた群(n=27)とPCSK9バリエントまたは病的変異を有していない陰性群(n=297)では、CADの発症率に有意差は認められなかった(Table 1-6)。LDLR変異を有する群の中で、c. 10G> A : p. (Val4Ile) バリエントを有していた群では、ATTレベルに差は認められなかったが、LDL-C値およびCADの発症率は有意に高かった (Table 1-6, Fig1-5)。

Table 1-6 Effect of PCSK9 Val4Ile, L21_22insL/Ala53Val, or Glu32Lys on clinical phenotype in heterozygous FH patients with or without LDLR mutations at the age of ≥30 yrs

Genotype	No. of subjects	Untreated LDL-C (mg/dL)*	ATT (mm)*	Prevalence of CAD (%)**	Smoking (past / current) (%)**
Patients with PCSK9 variants and without LDLR mutations					
Val4Ile					
wild type	104	213 ± 57	11.5 ± 4.2	31	38
mut type	4	211 ± 36	8.8 ± 1.5	0	0
p-value		0.96	0.21	0.99	0.99
L21_22insL/Ala53Val					
wild type	98	215 ± 57	11.5 ± 4.3	32	38
mut type	10	189 ± 37	10.5 ± 2.7	10	20
p-value		0.25	0.48	0.18	0.27
Glu32Lys					
wild type	95	212 ± 57	11.7 ± 4.2	32	38
mut type	13	214 ± 51	8.7 ± 1.4	18	27
p-value		0.90	0.022	0.24	0.29
Patients with both PCSK9 variants and LDLR mutations					
Val4Ile					
wild type	113	256 ± 63	13.4 ± 5.0	31	42
mut type	7	355 ± 96	16.3 ± 7.7	71	71
p-value		0.0036	0.16	0.048	0.15
L21_22insL/Ala53Val					
wild type	110	262 ± 67	13.5 ± 5.3	34	44
mut type	10	241 ± 75	14.9 ± 4.3	33	44
p-value		0.47	0.44	0.99	0.96

ATT, achilles tendon thickness; CAD, coronary artery disease

All values are mean ± SD.

*The p-value was calculated based on the Linear regression test.

**The p-value was calculated based on the Logistic regression test.

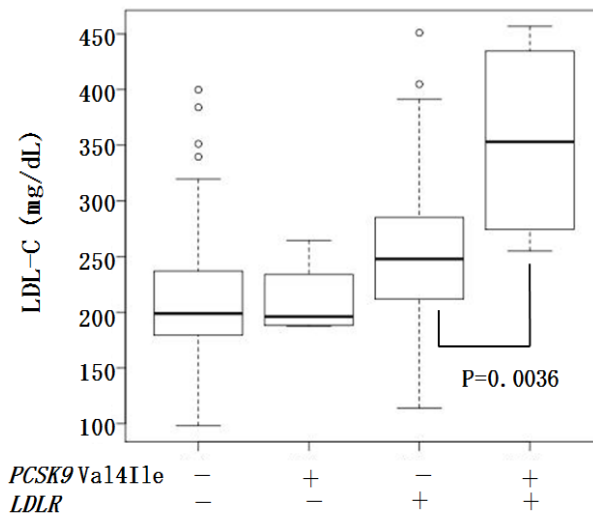


Fig.1-5 The increase of serum LDL-C levels in heterozygous FH patients carrying both PCSK9 Val4Ile and LDLR mutations at the age of ≥ 30 years. Serum LDL-C levels were compared between the PCSK9 Val4Ile variant carriers and noncarriers with or without LDLR mutations at the age of ≥ 30 years. P values are from a linear regression test.

4項 PCSK9とLDLRのダブルヘテロ変異の認められた患者の臨床経過について

PCSK9 c.10G>A : p. (Val4Ile) バリエントとLDLR変異を有したダブルヘテロ変異は、HOFH様の臨床像を示していた。本研究では、PCSK9 c.10G>A : p. (Val4Ile) バリエントとLDLR変異を有したダブルヘテロ変異の病態を理解するために、ダブルヘテロ変異を有していた患者の臨床経過を示した。

患者は35歳時に他院において急性心筋梗塞と診断され、国立循環器病研究センターに緊急搬送された。冠動脈造影（CAG）にて、#7 100%狭窄を認め、左室駆出率は56%であったが保存的加療となった。同時に、入院中にFHを指摘され、以後、代謝内科外来に通院開始となる。遺伝子検査の結果、LDLR のc.1124A>G: p. (Tyr375Cys) 病的変異とPCSK9 c.10G>A : p. (Val4Ile) バリエントのダブルヘテロ接合体であった (Fig 8) II-1)。未治療時の検査所見は、TC; 452 mg/dL, LDL-C; 400 mg/dL, TG; 165 mg/dL, HDL-C; 19 mg/dL, ATT は16 mmと肥厚が認められた。57歳時に労作時の息切れの症状を示し、CAGが施行され、左前下行枝（LAD）の慢性閉塞性病変に対し経皮的冠動脈形成術（PCI）が施行された。

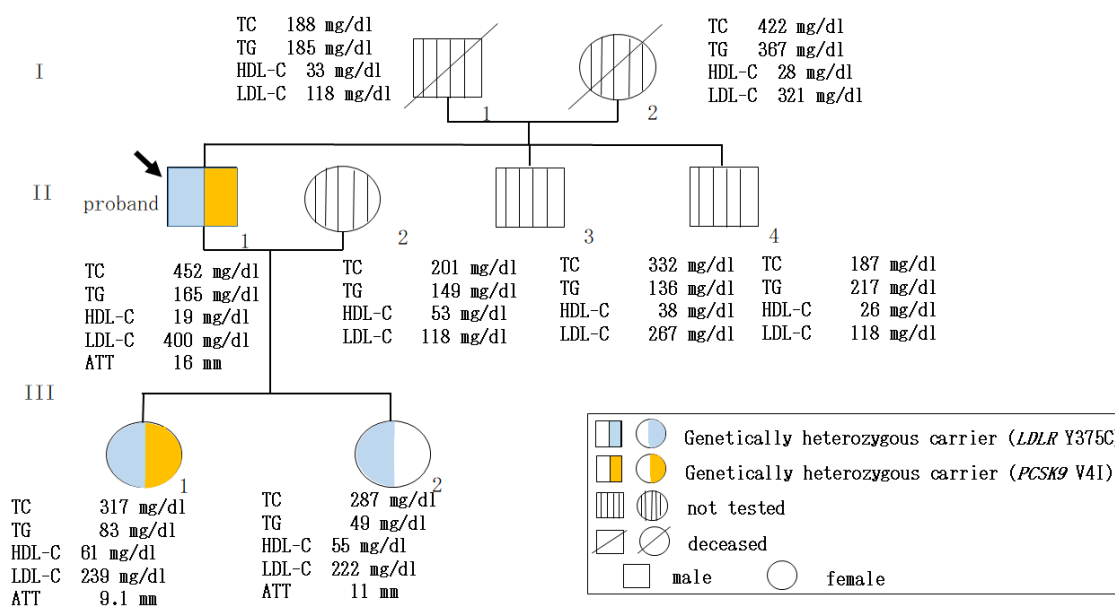


Fig. 1-6 PCSK9/LDLR ダブルヘテロ変異を有する FH 患者の家系図

家系図を (Fig. 1-6) に示した。臨床診断および遺伝子検査の結果から、5例 (I-2, II-1, II-3, III-1, III-2) が FH と診断された。長女 (III-1) 29才は、LDLR と PCSK9 のダブルヘテロ接合体であった。未治療時の検査所見は、TC; 317mg/dL, LDL-C; 239 mg/dL, TG; 83 mg/dL, HDL-C; 61 mg/dL, ATT; 9.1mm、次女 (III-2) 26才は、LDLR 変異のみを有していた。未治療時の検査所見は、TC; 287 mg/dL, LDL-C; 222 mg/dL, TG; 49 mg/dL, HDL-C; 55 mg/dL, ATT; 11 mmであった。

発端者の治療経過について、57歳時の入院時の薬物治療では、アトルバスタチンカルシ

ウム 30 mg、コレスチミド 3000 mg、エゼチミブ 10 mg内服を継続したが、TC；217 mg/dL，LDL-C；159 mg/dLでコントロールが難しかった。その後、ロスバスタチンカルシウム20 mg，コレスチミド3000 mg，エゼチミブ 10 mgに加えてPCSK9抗体医薬（エボロクマブ 140 mg 3本）の投与を開始したところ、TC；86 mg/dL，LDL-C；32 mg/dLまで低下した。動脈硬化性疾患予防ガイドライン2017で提言されているLDL-C管理目標値では、二次予防のFHや急性冠症候群については、LDL-C<70 mg/dLとなっており、PCSK9抗体医薬によって目標値に到達でき、その有効性が認められた（Fig. 1-7）。

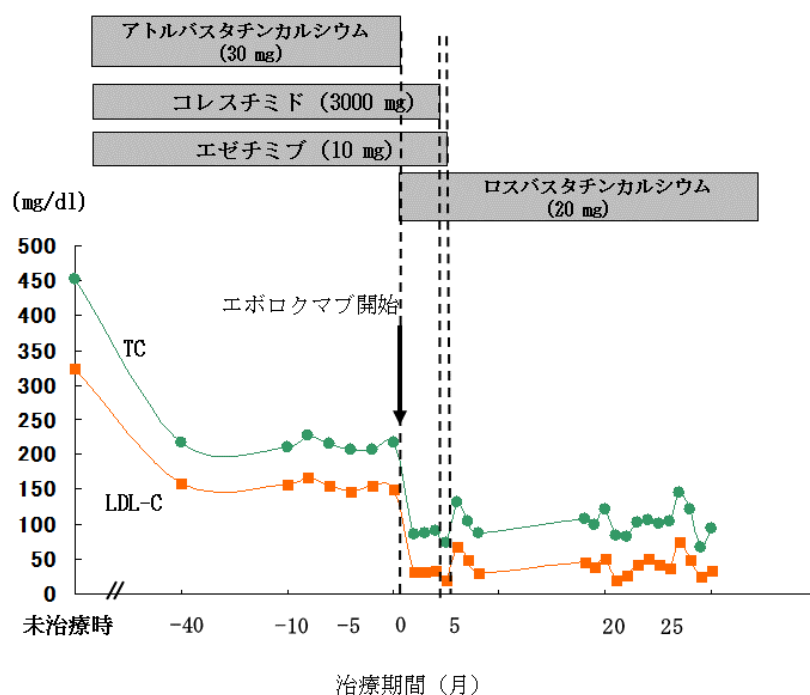


Fig. 1-7 PCSK9/LDLR ダブルヘテロ変異を有する FH患者の臨床経過
PCSK9抗体医薬（エボクロマナブ）投与後、TC値、LDL-C値の低下が認められた。

考察 1

本章では、HeFHにおける*LDLR*および*PCSK9*の病的変異およびバリエントの臨床的意義について評価を行った。

*LDLR*および*PCSK9*遺伝子の病的変異およびバリエントの分布は、これまでに北陸地方のHeFH患者で報告されている結果とは異なっていて、地域差が認められた。本研究で示された病的変異およびバリエントの分布は、解析した患者の67.5%が関西地方に住んでおり、日本の大都市圏の1つであることから人口の流入が大きいこと、残りの患者は、日本全国から来られている患者であった。したがって、日本全体の分布を反映している可能性があると考えられた。さらに、*LDLR*の頻度の高い病的変異として5つを検出したが、北陸地方の報告とは異なっていて、北陸地方では、FH患者（ $n = 1054$ ）の44.5%で3種類の頻度の高い*LDLR*変異が報告されていて、c. 2431A> T : p. (Lys811*)（ $n = 292$; 28%）、c. 2312-3C> A（ $n = 119$; 11%）、およびエクソン2-3の欠失（ $n = 58$; 5.5%）であった。c. 2431A> T : p. (Lys811*)変異は、共通して頻度の高い変異であった。この変異は、多くの子孫に引き継がれ、長期間にわたり広範囲に広まった変異ではないかと推測され、「founder effect ; 創始者効果」の例であると報告されている(36)(58)。

日本人HeFHにおける*LDLR*および*PCSK9*の病的変異の臨床的特徴については、*LDLR*病的変異を有する患者群は*PCSK9*病的変異を有する患者群に比べてLDL-C値やATTの肥厚の有無の割合が高かったことから、*LDLR*病的変異を有する患者はより重篤な病態を示しており、*PCSK9*の病的変異を有する患者では比較的mildな病態を示すことが明らかになった。*PCSK9*病的変異の中で最も頻度の高かったc. 94G> A : p. (Glu32Lys)（ $n = 45$; 6.9%）病的変異のInvitroの研究では、c. 94G> A : p. (Glu32Lys)病的変異を導入したHepG2細胞は、野生型で培養されたものよりも有意に大量の*PCSK9*を培地に分泌したと報告されていて（139%±13% vs. 100%±3%, $p < 0.01$ ）(59)、機能亢進型変異であるが、欧米で検出されているc. 1120G> T : p. (Asp374Tyr)病的変異のように重症な病態を示す変異とは異なっていた。したがって、日本人HeFHで見られる*PCSK9*病的変異は、臨床的に軽度なものが多いと言える。

*LDLR*や*PCSK9*遺伝子の病的変異と、CADの発症率や発症年齢との関連性について評価したところ、*LDLR*の病的変異を有していた患者の割合は、CADの発症年齢が低いほど高く、CADの発症年齢の増加とともに有意に減少していた。これまでに*LDLR*変異を有するFHは、*LDLR*変異を有さないFHに比べてLDL-C値が高値でCADの発症率も高いことが報告されているが(60)、本研究において*LDLR*遺伝子の病的変異は、特に若年におけるCAD発症に強く関わっていることを示した。一方、FHにおけるCADのリスク増加には、LDL-C値に加えて、糖尿病、高血圧、喫煙など、一般的なのリスク因子が関連していることが示されているが(61)(62)、HEFH患者においては、これらのリスク因子は、高齢でのCADの発症に関連しているのではないかと考えられた。したがって、*LDLR*病的変異は、FHにおいてCADを早期に発症する、重篤な病態をとると考えられた。

FHの遺伝子解析は、FHであるという確定診断を下せるだけではなく、リスクの高いFH患者を特定し、より早期に積極的に治療を開始することで、FHの予後を確実に改善することができる。本研究で示した結果は、今後の遺伝子データベースを作成するのにも有用なものであったと言える。

*PCSK9*病変の変異については、*LDLR*の病変の変異を有する患者に比し軽度の病態を示していた。しかし、*LDLR*病變の変異に加えてc. 10G> A : p. (Val4Ile) バリアントも有していたダブルヘテロ変異群においては、LDL-C値が、*LDLR*変異のみを有する患者に比べて高値でありCADの発症率も高値であった。c. 10G> A : p. (Val4Ile) バリアントの有無と病態との関係については、本研究において、日本人HeFHで初めて示すことが出来た。アレル頻度(0.063)は、日本人一般母集団のアレル頻度(0.025)よりも高かったが、このバリアントは、ACMG / AMPガイドラインでは、病態への関与がない良性バリアントに分類されている。しかし、*LDLR*病變の変異とc. 10G> A : p. (Val4Ile) バリアントのダブルヘテロ変異群においては、LDL-C値 355 ± 96 mg/dLと我々のこれまでの結果から得られた*LDLR*変異のみを有する患者 (256 ± 63 mg/dL) に比べても高値であったことは、c. 10G> A :

p. (Val4Ile) バリアントが加わることにより他の遺伝、環境要因なども加わって、LDL受容体代謝経路に影響を及ぼし、病態の重症度に関わっているのではないかと考えられた。本研究から、*LDLR*病變の変異とc. 10G> A : p. (Val4Ile) バリアントのダブルヘテロ変異は、臨床的にHoFH様病態を示すことを明らかとなった。その臨床経過を示すために、*PCSK9*と*LDLR*のダブルヘテロ変異が認められた症例を示した。本症例では、スタチン系薬剤やエゼミチブなどの薬物治療では十分な効果は得られなかったが、*PCSK9*抗体医薬(エボロクマブ)の投与を開始したところ、TC ; 86 mg/dL, LDL-C ; 32 mg/dLまで低下させることができた。スタチンやエゼミチブについては、*PCSK9*変異により*LDLR*の分解能がさらに増強されていたことやLDL-C値がHoFHのように非常に高値を示していたことから、効果が十分でなかったものと考えられた。そこで*PCSK9*抗体医薬により*PCSK9*の働きを阻害することによりLDL受容体の分解を抑えLDL受容体を増加させることによってLDL-C値を低下させることができたと考えられた。*PCSK9*抗体医薬 ; エクロナマブの大規模試験(TAUSSIG試験)における*LDLR* と*PCSK9* のダブルヘテロ変異群では65%のLDL-C低下率であったとの結果と一致する。*LDLR*変異と*PCSK9*変異のダブル変異に対しての*PCSK9*抗体医薬の有用性が確認できた16)。遺伝子解析によりtrueHoFHかダブルヘテロタイプなのか、またはコンパウンドヘテロタイプなのかを同定することにより、正確な治療方針が決められることが示された。本研究で示された結果は、遺伝子解析結果による重症患者群の分類や患者個々に適した治療方針を決める上で、非常に有用な結果であった。

臨床的にFHと診断された患者の中で、*LDLR*および*PCSK9*バリアントや変異が認められなかった患者群の割合は38%であった。これまでに新たな原因遺伝子の可能性としていくつかの報告がなされている。IDOLとしても知られているMYLIP (*LDLR*の誘導性分解蛋

白) は、高TC値を示すことが示された63)。また、*STAP1*は、FHに関連した遺伝子であることが報告されている64)。LDLR変異またはPCSK9変異を有さない患者については、これらの遺伝子もしくは未知の原因遺伝子が存在しているかもしれない。今後、LDLR変異またはPCSK9変異を有さない患者群については、世代シーケンサーを用いた解析により、新しい遺伝子の関与が明らかになる可能性がある。

本研究の課題は、観察研究であり、CADのイベントのみが考慮されたことである。治療中の患者と治療を受けていない患者の両方が含まれていることや治療内容は期間も考慮されていない。さらに、国立循環器病研究センターはCADに特化した施設である。したがって、当センターのFH患者におけるCADの有病率は、他の施設のFH患者よりも高い可能性がある。したがって、他施設による共同研究により、CADの詳細な情報を基にした研究が必要であると考ええる。

2章 FHにおける大動脈弁狭窄(Aortic Stenosis; AS)の病変の特徴について

FHは、出生時からLDL-C値が高値のため、若年性動脈硬化症が進行し、CADの発症率が高いことに加え、ASが起きやすく、特にHoFHにおいては、ASに加えて大動脈弁上狭窄(Supravalvular Aortic Stenosis; SVAS)の頻度が非常に高いことが知られている⁶⁵⁾。ASは、弁尖に長期間に及ぶ炎症性反応による肥厚、癒着および硬化、から最終的に石灰化により弁の狭窄が生じる。その原因は、先天性、リウマチ性、加齢による変性などに分けられる。近年、人口の高齢化やリウマチ性心疾患の減少に伴い特に高齢者のASは大動脈弁の加齢による変性と石灰化によるものが増加してきている⁶⁶⁾。ASの石灰化のリスクとしては、高齢が強いリスクであり、さらに動脈硬化のリスク因子でもある脂質異常症やマクロファージの集積などの炎症反応、酸化ストレス反応などもリスク因子になることが報告されている⁶⁷⁾⁶⁸⁾⁶⁹⁾⁷⁰⁾。また、LDL-C値上昇の遺伝学的素因が、大動脈弁石灰化やASの発症と関連性があることが、欧米での長期的な大規模前向きコホート試験で報告されている⁷¹⁾。

これまでに、HoFHでは、比較的短期間で大動脈弁が損傷し、HeFHでは、HoFHよりも遅くに弁の損傷を生じ、非FHでは、長年にわたって徐々に障害が生じると言われている²⁰⁾。HoFHのASの特徴として、大動脈起始部と大動脈弁に強い変化があることが報告されている²²⁾が、HoFH、HeFHおよび加齢性によるASの大動脈弁に対する病理学的に詳細なことはあまり明らかになっていない。

ASの手術適応の基準は、大動脈弁の弁口面積(狭さの程度)、弁を通過する血流速度(速いほど重症)、左心室と大動脈に生じる圧較差(大きいほど重症)などから、軽症、中等症、重症に分類され、重症以上で手術適応となる。ASにおける病変の特徴を理解することは、大動脈や大動脈弁におけるアテローム性動脈硬化病変の改善、さらにはASの進行抑制に向けて重要であると考ええる。

本研究では、FHにおけるASの特徴を明らかにするため、ASで弁置換された大動脈弁病理標本を用いて、HoFH患者、HeFH患者および非FH患者の大動脈弁狭窄症について病理組織学的に検討を行った。

1項 手術時の年齢と臨床所見

Table 2-1にAVR施行時に病理検査が行われたHoFH、HeFH、非FHの臨床所見を示した。HoFHの手術時の平均年齢は、HoFHは31歳、HeFHは71歳、非FHは68歳であった。手術時の年齢は、HoFHにおいて、優位に低年齢であり、本疾患が若年齢からASが進行して手術に至ることが明らかになった (Fig. 2-1)。CADを合併していた患者は、HoFHおよびHeFHでは全例で認められ、非FHは44%であった。これらの結果は、CADにおいて累積LDL-C値との関係が報告されており、ASについても同様な発症のメカニズムがあることが示唆される。リスク因子については、高血圧症を合併していた患者は、HoFHは1例 (33%)、HeFHは3例 (100%)、非FHでは12例 (67%) であった。他のリスク因子として、糖尿病を有していた患者は、HeFHは3例 (100%)、非FHでは10例 (56%) であった (Table 2-1)。

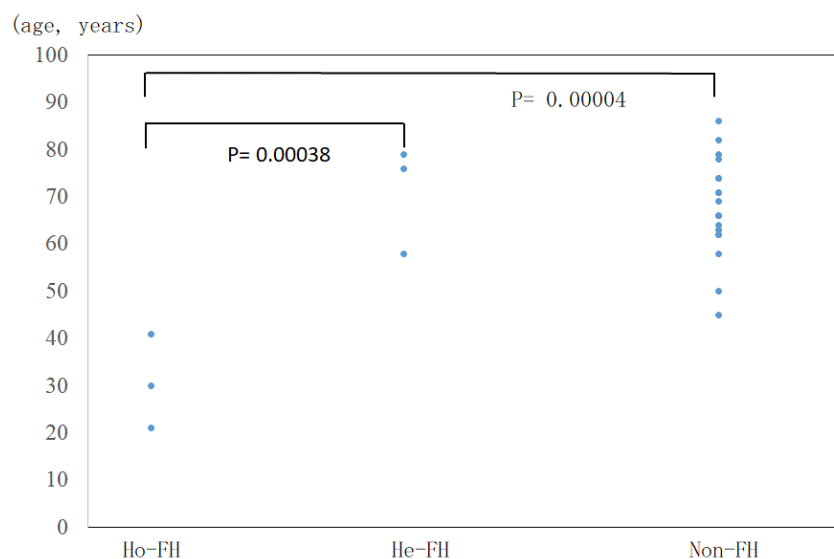


Fig. 2-1 Comparison of Age at Operation of AVR

AVR; Aortic valve replacement, Ho-FH; Homozygous Familial Hypercholesterolemia, He-FH; Heterozygous Familial Hypercholesterolemia; Non FH; non-Familial Hypercholesterolemia

Table 2-1 Clinical Characteristics of the AS patients with Hyperlipidemia

	Ho-FH (n=3)	He-FH (n=3)	non-FH (n=18)	p-value (ANOVA test)
Age (yrs) at AVR	31±10 *, **	71±11	68±11	<0.001
Female (%)	2 (66.7)	2 (66.7)	9 (50)	NA
AVA (cm ²)	0.9±0.1	0.8±0.2	1.0±0.6	0.821
peak velocity (m/sec)	5.4±1.6	4.7±1.2	4.0±1.0	0.147
Hypertension (%)	1 (33.3)	3 (100)	12 (66.7)	0.304
Diabetes mellitus (%)	0	3 (100)	10 (55.6)	0.060
CAD (%)	3 (100)	3 (100)	8 (44)	0.083
TC (mg/dL) pre-mediation	734±180 *, **	266±58	227±45	<0.001
TC (mg/dL) at AVR	260±28 *, **	151±10	200±25	0.016
LDL-C (mg/dL) pre-medication	546 (n=1)	186±50	127±35	NA
LDL-C (mg/dL) at AVR	200±2 *, **	94±19	123±22	0.016

AS; aortic stenosis; AVA; aortic valve area, TC; total cholesterol, LDL-C; low-density lipoprotein cholesterol
 *p<0.05 versus He-FH, **p<0.05 versus non-FH, based on the Tukey's HSD (honestly significant difference) test.
 TC and LDL-C pre-medication of Ho-FH are the data before apheresis and medication and those of He-FH and non-FH show the data at initial diagnosis before induction of statin.

2項 FHおよび非FHにおけるAS病変の比較

術前の各患者における重症度は、大動脈弁口面積、大動脈弁通過最高血流速度で評価される。術前の心エコー図所見では、大動脈弁弁口面積は、HoFHは $0.9 \pm 0.1 \text{ cm}^2$ 、HeFHは $0.8 \pm 0.2 \text{ cm}^2$ 、非FHでは $1.0 \pm 0.6 \text{ cm}^2$ であった。大動脈弁通過最高血流速度は、HoFHは $5.4 \pm 1.6 \text{ m/s}$ 、HeFHは $4.7 \pm 1.2 \text{ m/s}$ 、非FHでは $4.0 \pm 1.0 \text{ m/s}$ であった。ASの重症度評価分類は、大動脈弁口面積が 1.0 cm^2 、大動脈弁通過最高血流速度が 4.0 m/s で重症とされており、HoFHおよびHeFHは重度であり、非FHは中等度から重度であった (Table 2-1)。全ての症例で重度であるかまたは重度に近く病態の進行速度により弁置換手術が必要と判断され手術を施行された症例であった。また、HoFHでは、エコー図所見から全症例にSVASが認められた。一般的にHoFHでは、SVASとASを高頻度に発症している例が多く、その頻度もHoFHの41%であったとの報告もある72)73)。一方、HeFHでは、その頻度が低いと報告されている74)。本研究では同様の結果が示された。

初診時の血清脂質値は、TC値は、HoFHは $789 \pm 217 \text{ mg/dL}$ 、HeFHは 204 mg/dL 、非FHは $227 \pm 45 \text{ mg/dL}$ であり、LDL-C値は、HoFHは 546 mg/dL 、HeFHは $186 \pm 50 \text{ mg/dL}$ 、非FHは $127 \pm 35 \text{ mg/dL}$ であった。(Table 7)。LDL-C値については、HoFH>HeFH>非FHの順で高値傾向を示していた。なお、HeFH患者は、全員が手術時までにスタチン系薬剤による薬物治療が行われ、HoFH患者においても手術時には薬物治療やLDLアフェレシス治療により血清脂質値がコントロールされていた。

次に手術前における大動脈弁石灰化の比較を行った。まず、心臓CT検査では、断層撮影画像から石灰化の有無を観察した。HoFHの女性の症例では、大動脈弁肥厚が認められたが、弁上大動脈硬化を含む明らかな石灰化は認められなかった。HeFHの女性の症例では、大動脈および僧帽弁および冠状動脈のカルシウム沈着が認められた。非FHでは高度な石灰化が認められた。次に病理学的に大動脈弁の石灰化について、顕微鏡による準定量的評価により石灰化沈着の程度(平均スコア)を算出し比較した。石灰化スコアの算出は、石灰化の面積が10%以下で1、50%以上が3、その間を2としてスコア化した。HoFHは0.6、HeFHは3.0、非FHは2.5であった。高度な石灰化沈着が認められた割合は、HoFHは0%、HeFHは100%、非FHは56%であった (Table 2-2)。

HoFHにおいては、顕微鏡での準定量的評価では、石灰化スコアは非常に低く(平均スコア0.6)、肉眼的には動脈弁石灰化は認められなかったが、黄色の線維硬化性病変が見られた (Fig 8)。

Table 2-2 Histological Calcific Score (HCS) of Aortic Valves

	Ho-FH (n=3)	He-FH (n=3)	non-FH (n=18)	<i>p-value</i> (ANOVA test)
HCS	0.6*. **	3.0	2.5±0.6	<0.001
Severity of calcification Calc area of aortic valve >40%	0	3 (100%)	10 (56%)	

HCS: Histological Calcification Score . 0; ; calc area <5%, non, 1; calc area <15%, 2; calc area 15 <40%, 3; calc area more than 40%

*p<0.001 versus He-FH , based on the Tukey's HSD test

**p<0.001 versus non-FH, based on the Tukey's HSD test

本研究の結果で、血清脂質値と大動脈弁石灰化との関連性を評価したところ、特に非FHでは、個々の症例において、TC値やLDL-C値が高い症例でも大動脈弁石灰化の程度が軽度な症例や、反対に、TC値やLDL-C値が低い症例において大動脈弁石灰化の程度が非常に高度である症例が認められていた。また、非FHでは、初診時においてすでに脂質低下薬による治療をされていた症例やそうでない症例などもあった。したがって、大動脈弁石灰化に対して、TC値・LDL-C値の影響について結論はでなかった。しかし、大動脈弁石灰化の有無と関連因子について検討したCardiovascular Health Study (CHS) では、心臓CT検査で大動脈弁石灰化の有無を評価し、石灰化の危険因子は、年齢、男性、低身長、喫煙歴、高血圧歴やリポ蛋白 (a) (Lp (a)) 値、LDL-C値が有意であったと報告されている72)。さらに、LDL-C値、TG値上昇と大動脈弁石灰化やASの発症との関連への遺伝学的素因の関与について、遺伝学的リスクスコア (GRS) を用いて検討が行われ、GRSに基づく遺伝学的なLDL-C値の上昇が石灰化およびASの発症と関連することが報告されている75)。また、AS患者において冠動脈や大動脈弁の石灰化に影響する因子を調べた報告では、LDL-C値が高くなると石灰化病変が進行しやすいとも報告されている76)。

顕微鏡観察による組織病理学的所見およびApoEおよびCD68抗体を用いた免疫組織化学的所見から比較を行った。ApoEについては、HoFH、HeFH、非FH患者において高度に発現していて各患者群間での差は観察されなかった。次に、各患者群での特徴的所見として、HoFHでは、大動脈側 (fibrosa) にCD68の発現が認められ、脂質を含む泡状マクロファージの蓄積を示していた (Fig. 2-2 A-3、A-4およびA-5)。さらに、バルサルバ洞における高度な脂質沈着がHoFH患者で観察された (Fig. 2-2 B-1およびB-2)。

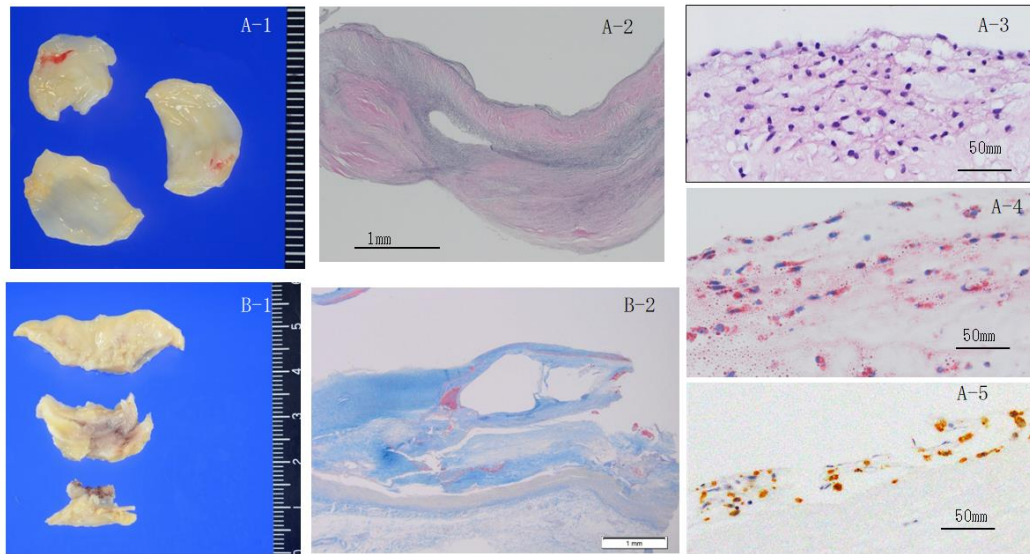


Fig.2-2 A: Representative 41 years old female case of excised aortic valve in homozygous FH.
A-1: macroscopic appearance of fibrous thickening all cusps. A-2: Fibrous thickened cusp without calcification, EVG stain. A-3: foamy macrophage accumulation of aorta side (Fibrosa) of cusp, H&E stain. A-4: Oil red O stain showing lipid in macrophages in Fibrosa. A-5: CD68 positive macrophages in Fibrosa. B-1: Supraaortic atherosclerosis of Valsalva sinus. B-2 Photomicrograph of B-1 showing atherosclerosis with calcification, Masson's trichrome stain

HeFHでは、石灰化結節の周囲にApoEが大量に沈着していたのが顕微鏡所見から観察された (Fig. 2-3) 。さらにHOFHと同様に大動脈側 (fibrosa) にCD68の発現が認められた。また、非FH患者では、約半数の症例で、石灰化とCD68の発現とアテローム性動脈硬化が大動脈弁中間層 (spongiosa) と左心室側で観察された (Fig. 2-4) 。

本研究から、HoFH では、顕著な高LDL-C血症による、LDLの直接的な関与が考えられた。一方、加齢性ASは、長期間にわたる炎症反応後の線維化、変性その結果としての石灰化が起こり、FHとは部位的、質的に異なることが示唆された。

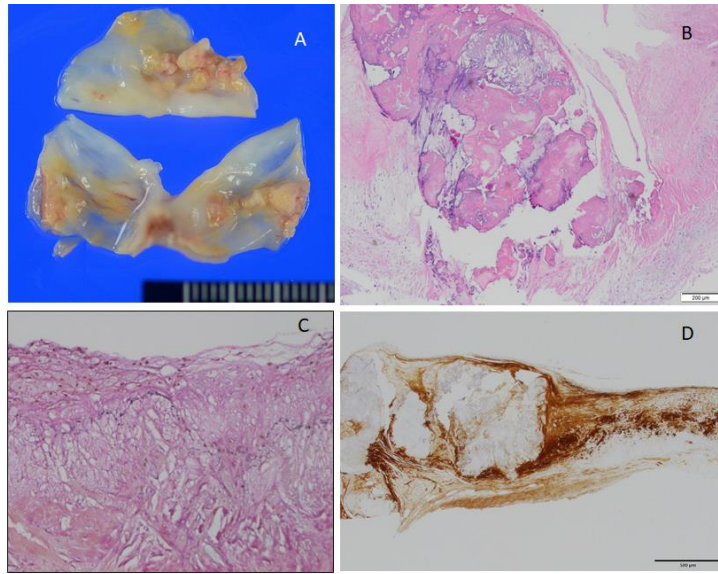


Fig.2-3 Representative male case of 58 years old of excited aortic valve in heterozygous FH.
A; macroscopic appearance of yellowish nodular calcification from aorta side view. B;Nodular calcification of Fig 3A, H&E stain. A-3; foamy macrophage and cholesterol crystal accumulation of aorta side of cusp, H&E stain. D: ApoE immunohistochemistry showing diffuse deposit Apo E in aortic valve.

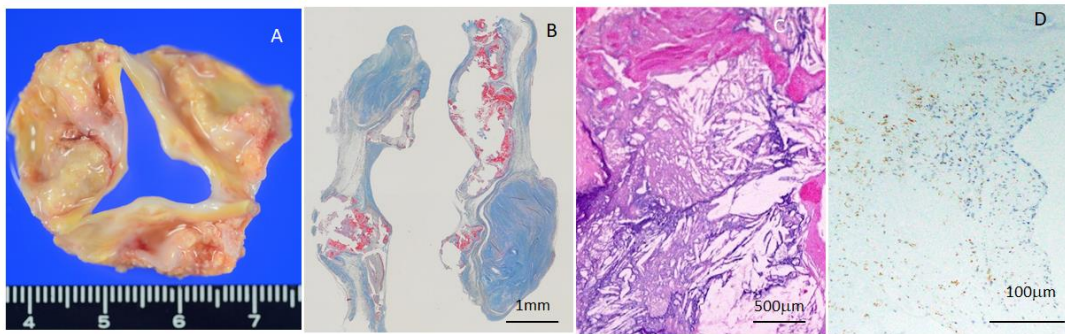


Fig.2-4 A: Representative excited aortic valve of non-FH male case of 69 years old.
A; macroscopic stenosis with massive nodular calcification of aortic valve. B; Nodular calcification, Masson's trichrome stain. A-3; Cholesterol crystal accumulation with calcification of cusp, H&E stain. D: CD68 positive macrophages accumulation around nodular calc not fibrosa.

考察 2

本章では、HoFH、HeFHおよび非FHにおけるASの病変の違いについて検討を行った。

手術時の年齢においては、HoFHにおいて、他の群に比較して極端に若年であったが、HeFHの手術時の年齢は、非FHと差がなかった。しかし、HeFHは、高血圧や糖尿病など他の動脈硬化リスク因子の影響もあわせてHoFHよりもやや遅く非FHよりも早く発症することが報告されている21)。HeFHにおいては、スタチン系薬剤、エゼチミブ、PCSK9阻害薬が使用されるようになり、LDL-C値のコントロールが改善されてきており、今後はASの発症年齢も非FHに近づいていくことが予想される。

CADを合併していた患者は、HoFHおよびヘテロ接合体FHでは全例で認められていた。このことは、CADにおいて累積LDL-C値との関係が報告されており、ASについても同様な発症のメカニズムがあることが示唆された。

病理学的所見では、HoFHの大動脈弁は、石灰化の程度は軽度であったが、HeFHや非FHでは高度な石灰化が示された。このことから大動脈弁肥厚の成因は、HoFHは石灰化が主な原因でないことが本研究から明らかとなった。

次にApoE、CD68抗体を用いた大動脈弁の免疫化学染色の結果、ApoEの沈着は、HoFH、HeFH、非FHの全症例で高度な沈着が認められ、発現の程度に差は認められなかった。CD68の沈着については、沈着領域に特徴が認められた。FHについては、HoFHおよびHeFHの全ての症例で大動脈側部位にCD68の沈着が認められた。一方、非FHについては、ほとんどが大動脈弁の中層や左室側にCD68の沈着が認められ、その多くは中層に認められた。大動脈側部位は、大動脈弁の開放時に折れ曲がる場所で、血行動態的に大きな負荷が生じる場所である。HoFHでは、そこにマクロファージが集積しLDLを取り込んで大動脈弁の肥厚を生じたことが本研究から示唆された。HoFHにおいては、大動脈のアテローム硬化が上行大動脈周辺でより強く、大動脈や大動脈弁に泡沫細胞の集積に加えApoBの沈着が見られたと報告されている22)。この報告では、大動脈のアテローム硬化では単球が、病変領域に存在する走化性因子によって動脈内膜に入り、これらの単球はマクロファージになり、蓄積されたLDLを取り込んでおり、大動脈弁においても、弁に付着したマクロファージがLDLを取り込んでいるものと考えられており、HoFHでは、大動脈弁の病変に対して、酸化LDLの関与が強く示唆されるものであった。

加齢性ASの大動脈弁病変の進展プロセスについては、シェアストレスなどにより、弁膜の内皮細胞傷害が生じ、そこに脂質の沈着、マクロファージやT リンパ球などの炎症細胞の集積、弁膜の線維芽細胞や平滑筋細胞の遊走や増殖などが起こることが報告されている77)。そして、弁膜内の線維芽細胞は骨芽細胞へ分化して石灰沈着に関与していることも報告されている78)。さらに、AS 病変には酸化LDL が局在して病変の進行に関与していることも報告されており79)、この酸化LDL は、平滑筋細胞や線維芽細胞の遊走や増殖を促進することが示されている80)。また、ヒト大動脈弁間質細胞において、Lp(a)が、石灰化に関係する酵素であるアルカリフォスファターゼの活性、リン酸やカ

ルシウム含量を増加させ、大動脈弁のアポトーシスや石灰化を誘発したと報告されている80)。したがって、AS 病変におけるマクロファージの活性化と酸化LDL の働きは、弁膜内の線維芽細胞や平滑筋細胞の遊走や増殖を促進し、大動脈弁の肥厚や線維化の進展に関与していると考えられている。

したがって、非FHについては、長期間における炎症反応によるもので、マクロファージも石灰化周辺に認められていたことから大動脈弁病変の肥厚は石灰化によることが主な原因であると考えられた。HeFHや非FHは、大動脈弁の石灰化やマクロファージの集積を認めており、大動脈弁の線維化の進展、その後石灰化へと進んでいったものと考えられた。HeFHについてはHoFHに比べてLDL-C値は高くなかったことからLDLによる大動脈弁の肥厚の進展には、FHにおけるCADの発症年齢と累積コレステロール量の関係と同様にLDL-C量が関与し、LDLによるAS発症の閾値があるのかもしれないと考える。一方、HoFHでは、ほとんど石灰化が認められなかったことから石灰化進展には時間を要することから、石灰化が生じる前に、マクロファージがLDLを取り込み大動脈弁の肥厚を早期に生じていたものと考えられた。本研究から、HoFH では、顕著な高LDL-C血症による、LDLの直接的な関与が考えられた。一方、加齢性ASは、長期間にわたる炎症反応後の線維化、変性その結果としての石灰化が起こり、FHとは部位的、質的に異なることが本研究から示唆された。

HoFHのASについては、LDL-C値をコントロールすることでAS病変の進展を抑制することが期待できる。さらに、HoFHの頻度は極めて低い、希少疾患であることから有用な結果であると言える。

本研究の限界として、手術時に提出された組織標本であるため、初期病変の状態についてはわからないため今後の課題としたい。

総括

本研究では、FHのオーダーメイド医療の確立を目標に遺伝子バリエーションの臨床的意義やASの病変に関する検討を行った。

第1章では、日本人HeFHにおけるバリエーションおよび病的変異における臨床的意義について示した。*LDLR*の病的変異を有していた患者は、CADの発症年齢が若い患者で高いこと、また、*LDLR*と*PCSK9*のダブルヘテロ変異ではHoFH様の病態を示すことを本研究で明らかにし、FHの重症度分類を行うことができた。したがって、遺伝子解析を行うことにより、重症度の高い変異を有する患者には、早期に薬物治療を開始し、厳格にLDL-C値を低下させることが可能となる。また、家族のスクリーニングも実施し、その子供に対しても、幼少期からの治療開始が可能となる。早期から治療ができれば、非FHと同じ年齢までCADの進展を遅らせることが期待できる。さらに、HeFH患者の中には、第一選択薬剤であるスタチン系薬剤に対して効果の低い患者が存在する。遺伝子変異の種類によりLDL受容体活性が異なっていることから遺伝子変異型により、スタチン系薬剤に対する治療効果の選別なども期待したい。

第2章では、ASにおける大動脈弁の病変について、HoFHでは、高LDL血症が主な要因で大動脈弁の肥厚が生じていたことが明らかとなった。これまで、ASの進展抑制については明らかにされていないが、FHのASについては、LDL-C値を低下させることによりASやSVAS進展抑制の可能性が考えられた。

今後、遺伝子解析を用いた診断や治療が必要となってくるが、現在、遺伝子解析の結果については、そのバリエーションや変異の意義について、様々なデータベースを用いて、疾患との関連性があるかどうかを分類しているが、臨床の場では苦慮していることも多い。したがって、検出されたバリエーションに対して、多くの臨床データをアノテーションとして加え、信頼できる疾患データベースを日常診療に反映させることが必要である。本研究で得られた結果は、今後のFHのオーダーメイド医療に貢献できるものと期待される。

実験の部

第1章

1 対象

2005年5月から2018年1月の間に臨床的に診断された801人のHeFH患者を対象として遺伝子解析を行った。500人の患者（67.5%）が国立循環器病研究センター受診患者で、残りは全国の他の病院から遺伝子解析を依頼された患者である。HeFHの診断は、日本のFHガイドラインに従った。①高コレステロール血症（未治療時のLDL-C値 180mg/dL以上）、②腱黄色腫（手背、肘、膝等またはアキレス腱肥厚）、③FHあるいは早発性冠動脈疾患の家族歴（2親等以内）、これらの中2項目以上でFHと診断した。臨床情報が不十分な患者33名と20歳未満の44名の患者を除外し、724人の患者について、臨床的特徴と遺伝子バリエーションとの関連を評価した。724人のHeFH患者の中で、発端者は607名であった。この研究プロトコルは、国立循環器病研究センターの倫理審査委員会（M17-56）によって承認されている。また、患者にはインフォームド・コンセントを行い、書類による同意を得ている。

2 DNA解析

(1) ゲノムDNA抽出

当該患者からEDTA-2Na入り採血管（インセパック II D；徳山積水工業）を用いて、採血を行った。

抽出は、自動DNA抽出装置（QIAAsymphony、QIAGEN社）を用いた。採血管を装置にセットした後、プロテインナーゼKなどの専用試薬および抽出したDNAを分注する専用チューブをセットし、全自動で抽出した。

抽出したゲノムは、超微量分光光度計（NanoDrop；サーモフィッシャー社）を用いて、吸光度260と280の比（260/280）による純度の確認および濃度の算出を行った。

その後、TEバッファー（Tris-EDTA Buffer）を用いて、10ng/ μ Lに希釈調整を行った。

(2) PCR反応およびシーケンス反応

LDLR（18エクソン）およびPCSK9（12エクソン）の全エクソンおよびエクソン/イントロン境界領域を含めてPCR反応を行った。プライマーの設計は、各エクソンから5'側上流および3'側下流の100～150塩基の場所にデザインした。また、各エクソンのフォワードプライマーの5'側にM13配列（5'-AAAACGACGGCCAGT-3'）をアダプターとして付与した。プライマー配列部位に一塩基多型（SNP）が存在していた場合、ホモ接合体波形を示すことから、SNPの存在していない場所でデザインした。

PCR反応液の組成は、ゲノムDNA20ng、プライマー5pmol、HotstarTaq（キアゲン社）0.5Uを含む反応混合物中で実施した。PCR反応は、95℃ 15秒（熱解離）、58～64℃ 30秒（アニーリング）、72℃（伸長）の3ステップを35回繰り返して行った。なお、PCRチューブは8

連チューブ(イナ・オプティカ)を用いた。

PCR産物の精製は、ExoSAP-IT (GEヘルスケア社)を用いた。PCR産物1.5 μ Lに酵素1.5 μ Lを混合し、37°C 60分反応後、80°C 15分反応させた。PCR反応およびPCR産物の精製は、サーマルサイクラー ABI 9700 (ABI社)を用いた。

Sequences of *LDLR* primers used

exon		Sequence (5' to 3')
promoter	F	AAAACGACGGCCAGTCAGCTCTTACCCGAGACC
	R	ACCTGCTGTGTCC TAGCTGG
1	F	AAAACGACGGCCAGTCACATTGAAATGCTGTAAATGACG
	R	GTCTCCCAGGGATGGAGTG
2	F	AAAACGACGGCCAGTCCTGATCGGATGACATTTCTG
	R	TTGAGACCAGAAATTCAGACC
3	F	AAAACGACGGCCAGTTCACTATATTGGCCAGGCTG
	R	AGCTGCCTTGCAGCTCGAG
4	F1	AAAACGACGGCCAGTATTAGCGCACCAGTGCTCAT
	R1	CCGAGCCATCTTCGCAGTC
4	F2	AAAACGACGGCCAGTAGTTGCTCTGTGACTCAGAC
	R2	GGCATGTGTGTGGAAATCCAC
5	F	AAAACGACGGCCAGTGCTGGGATTCCAGGCATGAG
	R	ACGCACAGCTGGTGCAGAG
6	F	AAAACGACGGCCAGTATGAATCCATTGTCATGCGTTC
	R	GACCGTGCGAGACTGTCTC
7	F	AAAACGACGGCCAGTATGGTGGCACATGCCTGTAG
	R	CTCTGGCCAGCCAATGATAG
8	F	AAAACGACGGCCAGTGATGAGGTCAGGTGATGACTG
	R	CCTCAGGAGCAACAGCCTC
9	F	AAAACGACGGCCAGTCACTGTGCCGTGTTCCCGTTG
	R	GTGTCTATAGGAAGAGACGCC
10	F	AAAACGACGGCCAGTGTGGCCAGCAATAGAACTCTAC
	R	GTCAGGCTGGTCTTGTATGATC
11	F	AAAACGACGGCCAGTAGCCTGAGCCTGGCTGTTTC
	R	GACAGACCAAGACCTCATCTC
12	F	AAAACGACGGCCAGTGGTGCTTTTC TGTAGGTCC
	R	GACCTCCTCCTAGTCACAAC
13	F	AAAACGACGGCCAGTGAGGTGGACGTTGCAGTGAG
	R	CGAGATCATCAGCTATACCAG
14	F	AAAACGACGGCCAGTGAACCTCCTTGTGGAAACTC
	R	GACTCATGAGTCC TTACAACG
15	F	AAAACGACGGCCAGTGGACTCACTCAAGAGATCCTC
	R	GTCAGCAAGGGAGTGAGGAC
16	F	AAAACGACGGCCAGTAGTGTCAGGGAGATGTGCC
	R	AGCTGTCTGATCTTGTCACTG
17	F	AAAACGACGGCCAGTGATTACAGGCGTGAGCCACC
	R	CATTACCTAATGCTGTCCCTC
18	F	AAAACGACGGCCAGTGCAGGTTGTGCAGAGCCTTG
	R	CAAGCCATTGCATGGGCACT

Sequences of *PCSK9* primers used

exon		Sequence (5' to 3')
1	F	AAAACGACGGCCAGTTGAAC TTCAGTCCTGCACAG
	R	ACTCCACTTCCTCTCTTACAT
2	F	AAAACGACGGCCAGTTGGTCCGCATTTGGTAACTTC
	R	CTCAATACATACITGCTGTCC
3	F	AAAACGACGGCCAGTAAGGCCAGGCTGTGGCTGTG
	R	AGTGGAGGTGCTGAGTCCCA
4	F	AAAACGACGGCCAGTTTAAGGCGCTTTCACAGTGC
	R	AGTACAGCTGCAACGCTCTG
5	F	AAAACGACGGCCAGTGTTTCATCCATCCAGCCACCT
	R	GGTTAGGAGACATTAGCTCTC
6	F	AAAACGACGGCCAGTTGACCAAACATCAGGCCACAA
	R	AGGAACGTGCCACAAGAAGC
7	F	AAAACGACGGCCAGTAACAGGTGTATAGCAGTTGTC
	R	GCACCATCAGGCC TACTTCAT
8	F	AAAACGACGGCCAGTTTACCTTCGAGAAGAGAGCTTA
	R	ATTGCACAGCCCTTTCAGAG
9	F	AAAACGACGGCCAGTGAGTATGTTCTTTAAGCCCTCC
	R	AGCTTACAGAAGAGCTGGAG
10	F	AAAACGACGGCCAGTGTCCTTGAGTTGATCCTGTC
	R	TGGAAC TGCAAGTCAGGCTT
11	F	AAAACGACGGCCAGTAGCTGGTCAGCTGCAGAGTT
	R	AGCATCTACCTGGCAAACCG
12	F	AAAACGACGGCCAGTTGGGAGATACACGGTTGTGT
	R	AAAGGCGGAAGCATCCCAT

シーケンス解析は、直接塩基配列決定法により、精製したPCR産物とBigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencingキット(ライフテクノロジーズジャパン社)のBigDye Terminatorのプレミックス試薬を添付の希釈液で4倍に希釈したもの8 μ Lに精製したPCR産物2 μ LおよびM13アダプター配列プライマー(10 μ M)を0.3 μ L加え、PCR用精製水で20 μ Lに調整後、サーマルサイクラーで反応させ、DyeEx 96 Kit (キアゲン社)のカラムを用いて精製した。調整した試料をABI Prism 3730 DNA Analyzer (ライフテクノロジーズジャパン社)を用いてシーケンス反応を行った。応終了後、Raw dataを抽出し、解析ソフトウェア Applied Biosystems™ Sequencing Analysis Software v5.1 (ライフテクノロジーズジャパン社)を用いて、塩基情報をテキスト形式および波形変換を行った。

テキスト形式に変換した塩基の文字列について、エクセルソフトを用いてシーケンスアライメントを行い、また、シーケンス波形を目視法により波形解読を行い、塩基配列の検出を行った。

(3) MLPA法

大規模な欠失・挿入変異については、P062B LDLR MLPAkit (MRC Holland社) を使用して解析した。

DNA (10ng/ μ L) 5 μ Lを98°C 5分反応後、Probe Mixture (SALSA probemix 1.5 μ L + SALSA MLPA buffer 1.5 μ L) を加え、95°C 1分→60°C 16-20時間反応する。この中にLigation Mix 32 μ L加え、54°C 15分→98°C 5分反応後、Polymerase mix 10 μ L加え、95°C 30秒、60°C 30秒、72°C 1分を35回繰り返して反応した。この反応溶液0.5 μ LにHiDi Formamide mix 9.2 μ L加えて、86°C 3分反応後、急冷した。ABI Prism 3130xl DNA Analyzer (ライフテクノロジーズジャパン社) を用いて反応を行った。

(4) 血清脂質

血清脂質値は、総コレステロール(TC)、トリグリセライド(TG)、HDLコレステロール(HDL-C)については、酵素法 (積水メディカル社) を用い、自動分析装置 (ラボスペクト008 ; 日立ハイテクノロジーズ社) により測定した。また、LDLコレステロール(LDL-C) は、Friedewald式(TG値 \geq 400を除く)を用いて算出した。アポリポ蛋白は、TIA法 (LSIメディエンス社) を用いた。これらは、外来初診時の値を用いた。

(5) 黄色腫

アキレス腱肥厚の測定は、触診に加えて、X線軟線撮影により下腿骨と足底が90度となるようにし、側面から腓骨外果中心に入射する。デジタルシステムの場合の撮影距離は120cm、撮影条件は50 kV、5.0 mAsとした。最大径 9 mm以上を肥厚ありと診断した。

(6) 冠動脈疾患

冠動脈疾患 (CAD : Coronary Artery Disease) CADの有無については、カテーテル治療や冠動脈バイパス手術の適応が、冠動脈狭窄が75%以上の場合となっており、いわゆる有意狭窄とされていることから、冠動脈造影が実施されていた患者において、75%以上の狭窄を確認した。

3 pathogenic variantsの分類

LDLRまたはPCSK9遺伝子で検出されたバリエーションは、ClinVar (NCBI; National Center for Biotechnology Information: 米国国立生物工学情報センターが提供しているデータベース) を使用して病原性または病原性の可能性があるかについては、British Heart Foundation によって公開されている FH の遺伝子変異のデータベース (LOLDv.1.1.0)、Exome Aggregation Consortium (ExAC)、Japanese Human Genetic Variation Database (HGVD)、東北メディカル・メガバンク 統合データベース、in silico tools/software、American Medical Genetics and Genomics (ACMG) およびAssociation

for Molecular Pathology (AMP) を使用して分類を行った。

また、あるバリエントが少なくとも2人以上で影響を受けており、複数の家系で認められていることが確認された場合、バリエントは、病原性について病原性ありもしくは病原性の可能性ありと判定した。

4 統計解析

連続変数は平均±SDまたは中央値（四分位範囲）として表示され、カテゴリカルデータはパーセンテージで表示されます。2つのグループ間の比較は、連続変数についてはStudent's t検定またはMann-Whitney U検定を使用し、カテゴリー変数の比較については、Fisher's exact検定、ロジスティック回帰検定、Cochran-Armitage検定を用いた。複数のグループ間の差の比較は、ANOVA検定またはKruskal-Wallis検定を用い、有意差が認められた場合は、Tukey-Kramer検定またはSteel-Dwass検定およびPearson's chi-squared検定、Fisher's exact検定によって有意差を調べた。また、遺伝子アレル頻度の違いは、Fisher's exact検定を用いた。p値が<0.05で有意差ありであると判定した。

2 章

1. 対象

国立循環器病研究センター病理部において、2015–2019年に大動脈弁狭窄症の手術後に病理検査を施行された同バイオバンク登録症例、約100例の中から、HoFH3例、HeFH3例、非FH18例を抽出した。

FHの診断は、「家族性高コレステロール血症診療ガイドライン 2017」に準じた⁹⁾。

なお、この研究は、国立循環器病研究センターの倫理審査委員会によって承認されている（R19085）。当該患者には、研究に参加するためのインフォームド・コンセントを行い承諾を得ている。

2. 方法

(1) 心エコー図所見

大動脈弁狭窄症の評価は、超音波診断装置（EPIQ 7C；フィリップスメディカルシステムズ社（Royal Philips；Amsterdam；Nederland）により計測された術前の心エコー図所見から、大動脈弁通過血流速度（Peak velocity；PV）、大動脈弁口面積（Aortic valve area；AVA）から判定した。

(2) 心臓CT所見

大動脈弁の石灰化評価の一つとして、心臓CT検査をいくつかの症例で実施しており

（Aquilion ONE、Canon Medical Systems、栃木、日本）、その所見から石灰化の程度を肉眼的（定性的）に評価した。

(3) 病理所見

(1) 大動脈弁組織の肉眼所見

HOFH、HEFH、非FHの各大動脈弁について、手術後に提出された組織の顕微鏡写真から評価した。

(2) 大動脈弁組織の病理学的解析

HOFH、HEFH、非FHの大動脈弁について、パラフィン切片を作製し、Hematoxylin and Eosin (H-E) 染色および線維症にはMasson' s Trichrome染色、弾性線維にはElastica van Gieson染色を行った。

H-E染色

染色液の調整は、①マイヤーのヘマトキシリン液は、ヘマトキシリン（メルク社）1.0 gに蒸留水 1,000mlを加え、ヨウ素酸ナトリウム（富士フイルム和光純薬社）0.2 gとカリウムミョウバン（シグマ社）50 gと氷酢酸（富士フイルム和光純薬社）5 mlを加えて調整した。②エオジン液は、1 %エオジン液（メルク社）と70%エタノールを1 : 3の割合で混合し、氷酢酸を100mlに1 滴の割合で加えて調整した。

染色手順は、脱パラフィンしてから水洗後、マイヤーのヘマトキシリンで5分後、水洗5分を行い、エオジン液で2分後、水洗を15秒後に脱水および透徹してから封入を行った。

Masson' s Trichrome染色

染色液の調整は、①ブアン液については、ピクリン酸（富士フイルム和光純薬社）飽和水溶液300mLにホルマリン（富士フイルム和光純薬社）100mLおよび氷酢酸20mLを加えて調整した。②第一媒染は、10%トリクロール酢酸（富士フイルム和光純薬社）と10%重クロム酸カリウム（富士フイルム和光純薬社）の等量混合して調整した。③ワイゲルトの鉄ヘマトキシリンは、ワイゲルト鉄ヘマトキシリン1（武藤化学社）とワイゲルト鉄ヘマトキシリン2（武藤化学社）を等量混合して調整した。④第二媒染は、2.5%リタングステン酸（富士フイルム和光純薬社）、2.5%リンモリブデン酸（富士フイルム和光純薬社）を等量混合して調整した。

⑤ポンソー酸フクシン・アゾフロキシンは、以下の i) ～ iv) を混合して調整した。

- i) 1%ポンソーキシリジン水溶液（CHROMA社）：60ml
- ii) 1%酸フクシン（富士フイルム和光純薬社）100ml + 氷酢酸1ml：20ml
- iii) 0.5%アゾフロキシシン（WALDECK社）100ml + 氷酢酸0.2ml：20ml
- iv) 0.2%氷酢酸：400ml

⑥メチル青は、メチル青（メルク社）0.4 g に氷酢酸8mlと蒸留水100mlを加えて混合し、20～30分煮沸し、冷却後濾過した。

染色手順は、脱パラフィンしてから水洗後、ブアン液60℃で20分後、流水水洗5分行い、第一媒染剤（10%トリクロール酢酸(富士フイルム和光純薬社) と10%重クロム酸カリウム(富士フイルム和光純薬社) の等量混合液を10分後、流水水洗5分行い、ワイゲルトの鉄ヘマトキシリンで核染色10分後、軽く水洗を行い、1%HCL/70%アルコール 5秒の分別後、流水水洗5分行う。続いて、第二媒染剤（2.5%リタングステン酸(富士フイルム和光純薬社) 、2.5%リンモリブデン酸(富士フイルム和光純薬社) の等量混合液を1分、1%オレンジG（メルク社）1分後に、1%酢酸水10秒→ボンソー・酸フクシン・アゾフロキシ液60℃ 20分行った。その後、1%酢酸水：10秒→2.5%リタングステン酸5分、1%酢酸水10秒→メチル青染色液7分、1%酢酸水10秒後、脱水および透徹してから封入を行った。

Elastica van Gieson染色

染色液の調整は、①ワイゲルトの鉄ヘマトキシリンは、ワイゲルト鉄ヘマトキシリン1とワイゲルト鉄ヘマトキシリン2を等量混合して調整した。②ワンギーソン液は、飽和ピクリン酸(富士フイルム和光純薬社) 100mlに、1%酸フクシン(富士フイルム和光純薬社) 10～15ml加えて調整した。

染色手順は、脱パラフィンしてから水洗後、前田レゾルシン・フクシン液（武藤化学社）5～10分後、軽く水洗し、1%塩酸70%アルコール分別を数秒後、水洗し、ワイゲルトの鉄ヘマトキシリン 10分、軽く水洗の後、1%塩酸70%アルコール分別 数秒後、流水水洗5分、ワンギーソン液 10～15分、70%アルコールで分別後、脱水および透徹してから封入を行った。

大動脈弁の石灰化の程度は、0：なし、1：軽度、2：中等度、3：高度とスコア化した。炎症性細胞浸潤の程度は、0：なし、1：軽度、2：中等度、3：高度とスコア化した。大動脈弁の厚さは、イメージングソフトウェアOlympus CellSens（オリンパス社：東京、日本）によって計測した。

(3) 免疫組織化学染色

各大動脈弁検体に対する免疫組織化学染色では、Apolipoprotein E（ApoE; Gene Tex社）、マクロファージマーカーであるCD68（CD68; Agilent社）に対するモノクローナル抗体を用い、Bondポリマーシステム・Refineキット（Leica Biosystems社）を用いて免疫組織化学染色を行った。組織切片に、一次抗体にウサギ抗マウスIgG抗体とペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体の複合体が形成させ、この複合体において、3, 3'-ジアミノベンジジン及び過酸化水素の反応によりスライドガラス上の陽性細胞が茶褐色に染色される。染色された組織標本を鏡検により観察し、面積はイメージングソフトウェアOlympus CellSens（オリンパス社：東京、日本）によって計測した。なお、こ

の反応は自動染色システム（Bond-III; Leica Biosystems社）を用いた。

(7) 血清脂質値

総コレステロール値(TC)は、酵素法（積水メディカル社）を用い、自動分析装置（ラボスペクト008; 日立ハイテクノロジーズ社）により測定されたデータを引用した。また、LDLコレステロール(LDL-C)は、Friedewald式(TG値 \geq 400を除く)を用いて算出した。これらは、外来初診時の値を用いた。

(8) 統計学的解析

連続変数については、ANOVA分析およびtukeyHSD検定を用い、カテゴリー変数についてはFisherの正確検定を用いて比較を行い、 $p < 0.05$ を有意差の判定とした。

謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご指導・ご助言を賜りました国立循環器病研究センター研究所・病態代謝部 斯波真理子 部長、病理部 植田初江 部長に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり終始丁寧なご指導を賜るとともに、有意義な議論をさせて頂いた国立循環器病研究センター研究所・病態代謝部 堀 美香 室長に深く感謝致します。

本研究の実験に際し、国立循環器病研究センター病理検査室のスタッフの皆様に多大なるご協力を頂きましたことに深く感謝致します。

本研究の実験に際し多大なるご協力を頂いたとともに、日頃より有意義な議論をさせて頂いた国立循環器病研究センター研究所・病態代謝部の皆様に深く感謝致します。

参考文献

- 1) Khachadurian AK, Uthman SM : Experiences with the homozygous cases of familial hypercholesterolemia. A report of 52 patients. *Nutr Metab* 1973 ; 15 : 132-140.
- 2) Bujo H, Takahashi K, et al : Clinical features of familial hypercholesterolemia in Japan in a database from 1996-1998 by the research committee of the ministry of health, labour and welfare of Japan. *J Atheroscler Thromb* 2004 ; 11 : 146-151
- 3) Nordestgaard BG, Chapman MJ, et al: Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* 2013; 34: 3478-3490.
- 4) Yamamoto T, Bishop RW, et al: Deletion in cysteine-rich region of LDL receptor impedes transport to cell surface in WHHL rabbit. *Science* 1986; 232: 1230-1237.
- 5) Tanzawa K, Shimada Y, et al: WHHL-rabbit: a low density lipoprotein receptor-deficient animal model for familial hypercholesterolemia. *FEBS Lett* 1980; 118: 81-84.
- 6) Watts GF, Lewis B, et al: Familial hypercholesterolemia: a missed opportunity in preventive medicine. *Nat Clin Pract CardiovascMed*. 2007; 4: 404-405.
- 7) Austin MA, Hutter CM, et al: Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review. *Am J Epidemiol* 2004; 160: 421-429.
- 8) Nordestgaard BG, Chapman MJ, et al : Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* 2013; 34: 3478-3490.
- 9) Harada-Shiba M, Arai H, et al, Guidelines for Diagnosis and Treatment of Familial Hypercholesterolemia 2017. *J. Atheroscler. Thromb.* 2018; 25: 751-770.
- 10) FH Foundation; Diagnostic Criteria for Familial Hypercholesterolemia (<https://thefhfoundation.org/diagnostic-criteria-for-familia-hypercholesterolemia>)
- 11) Harada-Shiba M, Ako J, et al : Prevalence of familial hypercholesterolemia in patients with acute coronary syndrome in Japan: Results of the EXPLORE-J study. *Atherosclerosis* 2018; 277: 362-368.
- 12) Rallidis L, Naoumova RP, et al: Extent and severity of atherosclerotic involvement of the aortic valve and root in familial hypercholesterolaemia. *Heart* 1998 ; 80 : 583-590.
- 13) Harada-Shiba M, Sugisawa T, et al : Impact of statin treatment on the clinical

- fate of heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb*
- 14) Uauy R, Vega GL, et al: Lovastatin therapy in receptor-negative homozygous familial hypercholesterolemia: lack of effect on low-density lipoprotein concentrations or turnover. *J Pediatr* 1988 ; 113 : 387-392.
 - 15) Stein EA, Honarpour N, et al: Effect of the proprotein convertase subtilisin/kexin 9 monoclonal antibody, AMG 145, in homozygous familial hypercholesterolemia *Circulation*, 2013 ; 128 : 2113-2120.
 - 16) Raal FJ, Hovingh GK, et al: Long-term treatment with evolocumab added to conventional drug therapy, with or without apheresis, in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: an interim subset analysis of the open-label TAUSIG study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2017; 5: 280-290.
 - 17) Raal FJ, Stein EA, et al : PCSK9 inhibition with evolocumab (AMG 145) in heterozygous familial hypercholesterolaemia (RUTHERFORD-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2015; 385: 331-40.
 - 18) Yagi K, Hifumi S, et al : Difference in the risk factors for coronary, renal and other peripheral arteriosclerosis in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Circ J* 2004 ; 68 : 623-627
 - 19) Nozue T, Kawashiri MA, et al: Cholesterol-years score is associated with development of senile degenerative aortic stenosis in heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb* 2006 ; 13 : 323-328.
 - 20) Otto CM, Lind BK, et al : Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. *N Engl J Med* 1999; 341: 142-147.
 - 21) Kawaguchi A, Yutani C, et al : Hypercholesterolemic Valvulopathy: An Aspect of Malignant Atherosclerosis. *Ther Apher Dial* 2003; 7: 439-443.
 - 22) Yutani C, Go S, et al : Autopsy findings in two patients with homozygous familial hypercholesterolemia. Special references to apolipoprotein B localization and internalization defect of low density lipoprotein. *Acta pathol jan* 1987; 37(9): 1489-1504.
 - 23) Brown MS, Goldstein JL: Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. *Science* 1974; 185: 61-63.
 - 24) Varret M, Abifadel M, et al : Genetic heterogeneity of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet* 2008 ; 73 : 1-13.
 - 25) Kajinami K, Fujita H, et al: Genetically-determined mild type of familial hypercholesterolemia including normocholesterolemic patients: FH-Tonami-2.

Circulation 80; II: 278,1989.

- 26) Hayato Tada 1, Masa-aki Kawashiri, et al : A Novel Method for Determining Functional LDL Receptor Activity in Familial Hypercholesterolemia: Application of the CD3/CD28 Assay in Lymphocytes. Clin Chim Acta 2009 ; 400: 42-47.
- 27) Vega GL, Grundy SM : In vivo evidence for reduced binding of low density lipoproteins to receptors as a cause of primary moderate hypercholesterolemia. J Clin Invest 1986 ; 78 : 1410-1414.
- 28) Nohara A, Yagi K, et al: Absence of familial defective apolipoprotein B-100 in Japanese patients with familial hypercholesterolaemia. Lancet 1995; 345: 1438.
- 29) Abifadel M, Varret M, et al: Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. Nat Genet 2003; 34: 154-156.
- 30) Lambert G, Charlton F, et al: Molecular basis of PCSK9 function. Atherosclerosis 2009; 203:1-7.
- 31) Allard D, Amsellem S, et al : Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. Hum Mutat 2005; 26:497.
- 32) Horton JD, Cohen JC, et al : Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. Trends Biochem Sci 2007; 32: 71-77.
- 33) Cohen JC, Boerwinkle E, et al : Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. N Engl J Med 2006; 354: 1264-1272.
- 34) Hopkins PN, Defesche J, et al : Characterization of Autosomal Dominant Hypercholesterolemia Caused by PCSK9 Gain of Function Mutations and its Specific Treatment with Alirocumab, a PCSK9 Monoclonal Antibody. Circ Cardiovasc Genet 2015; 8: 823-831.
- 35) Noguchi T, Katsuda S, et al: The E32K variant of PCSK9 exacerbates the phenotype of familial hypercholesterolaemia by increasing PCSK9 function and concentration in the circulation. Atherosclerosis 2010; 210: 166-172.
- 36) Yu W, Nohara A, et al : Molecular genetic analysis of familial hypercholesterolemia spectrum and regional difference of LDL receptor gene mutations in Japanese population. Atherosclerosis 2002; 165: 335-342.
- 37) Harada-Shiba M, Tajima S, et al : Analysis of hypercholesterolemia with family history and normal LDL receptor. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis 1991 ; 19 : 227-242.
- 38) Harada-Shiba M, Tajima S, et al : Siblings with normal LDL receptor activity and severe hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb 1992 ; 12 : 1071-1078.
- 39) Harada-Shiba, Takagi A, et al : Clinical features and genetic analysis of autosomal recessive hypercholesterolemia. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88:

2541-2547.

- 40) Jansen AC, van Wissen, et al : Phenotypic variability in familial hypercholesterolaemia: an update. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 165-171.
- 41) Thompson GR, Seed M, et al : Genotypic and phenotypic variation in familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1989; 9: 175-180.
- 42) Motazacker MM, James Pirruccello, et al; Advances in Genetics Show the Need for Extending Screening Strategies for Autosomal Dominant Hypercholesterolaemia. *Eur Heart J* 2012 ; 33 (11): 1360-1366.
- 43) Hobbs HH, Brown MS, et al : Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum. Mutat* 1992; 1(6): 445-466.
- 44) J Cameron OL, Holla JK, et al: Characterization of novel mutations in the catalytic domain of the PCSK9 gene. *J. Intern. Med* 2008; 263: 420-431.
- 45) T.Fasano T, Sun XM, et al : Degradation of LDLR protein mediated by 'gainoffunction' PCSK9 mutants in normal and ARH cells. *Atherosclerosis* 2009; 203: 166-171.
- 46) Sugisawa T, Okamura T, et al : Defining patients at extremely high risk for coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb.* 2012 ;19 (4): 369-75.
- 47) Ogura M, Hori M, et al : Association between cholesterol efflux capacity and atherosclerotic cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 36: 181-188.
- 48) Funahashi T, Miyake Y, et al : Mutations of the low density lipoprotein receptor in Japanese kindreds with familial hypercholesterolemia. *Hum. Genet* 1988; 79: 103-108.
- 49) Miyake Y, Tajima S, et al : A point mutation of low-density-lipoprotein receptor causing rapid degradation of the receptor. *Eur. J. Biochem* 1992; 210: 1-7.
- 50) Mabuchi H, Nohara A, et al : Hokuriku FH Study Group. Genotypic and phenotypic features in homozygous familial hypercholesterolemia caused by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) gain-of-function mutation. *Atherosclerosis* 2014; 236: 54-61.
- 51) Leren TP : Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet* 2004; 65: 419-422.
- 52) Sun XM, Eden ER, et al : Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolaemia. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1161-1169.

- 53) Marduel M, Carrié A, et al : Molecular spectrum of autosomal dominant hypercholesterolemia in France. *Hum Mutat* 2010; 31: E1811-1824.
- 54) Abifadel M, Rabès JP, et al: Mutations and polymorphisms in the proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) gene in cholesterol metabolism and disease. *Hum Mutat* 2009; 30: 520-529.
- 55) Pisciotta L, Priore Oliva C, Cefalù AB, Noto D, Bellocchio A, Fresa R, Cantafora A, Patel D, et al : Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2006; 186: 433-440.
- 56) Yue P, Averna M, et al : The c.43_44insCTG variation in PCSK9 is associated with low plasma LDL-cholesterol in a Caucasian population. *Hum Mutat* 2006; 27: 460-466.
- 57) Abifadel M, Bernier L, et al : A PCSK9 variant and familial combined hyperlipidaemia. *J Med Genet.* 2008; 45: 780-786.
- 58) Mabuchi M, Nohara A, et al : Molecular genetic epidemiology of homozygous familial hypercholesterolemia in the Hokuriku district of Japan. *Atherosclerosis* 2011; 214: 404-407.
- 59) Noguchi T, Katsuda S, et al: The E32K variant of PCSK9 exacerbates the phenotype of familial hypercholesterolemia by increasing PCSK9 function and concentration in the circulation. *Atherosclerosis* 2010; 210: 166-172.
- 60) Abul-Husn NS, Manickam K, et al: Genetic identification of familial hypercholesterolemia within a single U.S. health care system. *Science* 2016 Dec 23; 354 (6319) : pii.
- 61) Paquette M, Dufour R, et al : The Montreal-FH-SCORE a new score to predict cardiovascular events in familial hypercholesterolemia. *J. Clin. Lipidol* 2017; 11: 80-86.
- 62) Paquette M, Bernard S, et al : Diabetes is associated with an increased risk of cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia, *J. Clin. Lipidol* 2019; 13: 123-128.
- 63) Weissglas-Volkov D, Calkin AC, et al : The N342S MYLIP polymorphism is associated with high total cholesterol and increased LDL receptor degradation in humans. *J Clin Invest* 2011; 121: 3062-3071.
- 64) Fouchier SW, Dallinga-Thie GM, et al : Mutations in STAP1 are associated with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Circ Res* 2014; 115: 552-555.
- 65) Rallidis L, Naoumova RP, et al : Extent and severity of atherosclerotic involvement of the aortic valve and root in familial hypercholesterolaemia. *Heart* 1998 ; 80 : 583-590.

- 66) Otto CM, Kuusisto J, et al : Characterization of the early lesion of 'degenerative valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 1994; 90: 844-853.
- 67) Olsson M, Dalsgaard CJ, Haegerstrand A, et al. Accumulation of T lymphocytes and expression of interleukin-2 receptors in nonrheumatic stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 1162-1170.
- 68) Liberman M, Bassi E, et al : Oxidant generation predominates around calcifying foci and enhances progression of aortic valve calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 463-470.
- 69) Miller JD, Chu Y, et al : Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 843-850.
- 70) Smith JG, Luk K, et al : Association of low-density lipoprotein cholesterol-related genetic variants with aortic valve calcium and incident aortic stenosis. *JAMA* 2014 ; 312(17): 1764-1771.
- 71) Brook GJ, Keidar S, et al : Familial homozygous hypercholesterolemia: clinical and cardiovascular feature in 18 patients. *Clin Cardiol* 1989; 12: 333-338.
- 72) Summers RM, Andrasko-Bourgeois J, et al : Evaluation of the aortic root by MRI: insights from patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98: 509-518.
- 73) Rallidis L, Naoumova RP, et al : Extent and severity of atherosclerotic involvement of the aortic valve and root in familial hypercholesterolemia. *Heart* 1998; 80: 583-590.
- 74) Stewart BF, Siscovick D, et al : Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 630 -634.
- 75) Freeman RV, Otto CM : Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation* 2005; 111: 3316-3326.
- 76) Rajamannan NM, Subramaniam M, et al : Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation* 2003; 107: 2181-2184.
- 77) Stewart BF, Siscovick D, et al : Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 630 -634.
- 78) Hsu HH, Camacho NP : Isolation of calcifiable vesicles from human atherosclerotic aortas. *Atherosclerosis* 1999; 143: 353-362.
- 79) Stiko-Rahm A, Hultgårdh-Nilsson A, et al : Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 1099-1109.

80) Yu B, Hafiane A, et al : Lipoprotein(a) induces human aortic valve interstitial cell calcification. JACC Basic Transl Sci 2017; 2(4): 358–371.