

氏 名	はまき まさと 濱崎 真人
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	乙第 851 号
学位授与年月日	令和 5 年 6 月 29 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 3 項該当
学 位 論 文 名	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) 遺伝子変異の臨床的応用に関する研究
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 原 一 雄 (委 員) 教 授 山 田 俊 幸 准教授 海老原 健

論文内容の要旨

1 研究目的

*PCSK9*は脂質異常症、特に家族性高コレステロール血症(familial hypercholesterolemia: FH)の原因遺伝子として最近知られるようになった。*PCSK9* は低比重リポ蛋白 (low-density lipoprotein: LDL) を細胞に取り込む LDL 受容体 (LDL receptor: LDLR) に結合して血中 LDL コレステロール (LDL cholesterol: LDL-C) を上昇させ、心血管疾患リスクを高める。*PCSK9* と LDLR との結合の強さは *PCSK9* 変異によるアミノ酸置換によって増減し、機能亢進型と機能低下型の変異に分類される。また、頻度は東アジア地域で決して高くないが、FH スクリーニングでは必要な状況があり、その方法論は未発達である。本研究は *PCSK9* 遺伝子に着目し、その臨床応用を検討した。Study 1 では、*PCSK9* の新たな生物学的な機能解明のため、酸化ストレス関連分子と *PCSK9* 変異の関連を検討した。Study 2 では、コレステロール合成阻害薬への応答性を *PCSK9* 変異群における血中 LDL-C と *PCSK9* 値との相関から検討した。Study 3 では、*PCSK9* 変異を迅速に検出可能な遺伝子検査法を構築した。

2 研究方法

高 LDL-C 血症集団において、次世代シーケンサー (next-generation sequencer: NGS) の NextSeq 500 と疾患パネルの TruSight One Sequencing Panel (ともにイルミナ社) で *PCSK9* 変異を配列決定した。その後、遺伝子変異について、ClinVar と wANNOVAR から総合的にアノテーションし、機能亢進型変異を同定した。Study 1 では、高 LDL-C 血症集団の遺伝子変異群と細胞内の酸化ストレスの指標である gamma-glutamyl transpeptidase (γ GT) 活性との関連を、変異のない群を対照として分析した。Study 2 では、コレステロール合成阻害薬投与下の FH 集団を遺伝子変異別 (*PCSK9* 変異群、*LDLR* 変異群、変異なし群) にわけ、血中 *PCSK9* と LDL-C 値の間で相関分析で検定し、薬剤への応答性を比較した。Study 3 では、*PCSK9* 変異の臨床応用のため、遺伝子検出法の一つであるループ介在等温遺伝子増幅 (loop-mediated isothermal amplification: LAMP) 法と 10 塩基以下の短鎖 DNA 蛍光プローブ (short quenching probe: SQP) を用いた迅速な SQP ジェノタイピング法を新たに構築し、標準的な方法である NGS に対して感度と特異度を比較した。

3 研究成果

いずれの研究でも遺伝子解析の結果、日本人に高頻度な *PCSK9* の機能亢進型変異である p.V4I と p.E32K が同定された。Study 1 では、114 人の高 LDL-C 血症集団のうちの 12 人 (11%) で p.E32K が同定された。血中 LDL-C 値は、p.E32K 群と p.E32K なし群で 5.55 mmol/L vs. 5.67 mmol/L であった ($p=0.50$)。p.E32K 群で γ GT 活性の低値が有意に観察された (p.E32K 群と p.E32K なし群 : 21 IU/L vs. 30 IU/L, $p=0.03$)。Study 2 では、70 人の FH 集団のうち 7 人で p.V4I ($n=1$, 1%) もしくは p.E32K ($n=6$, 9%) が同定された。コレステロール合成阻害薬の投与下での血中 LDL-C 値は同等 (*PCSK9* 変異群、*LDLR* 変異群、変異なし群 : 4.06 mmol/L vs. 4.13 mmol/L vs. 3.55 mmol/L, $p=0.10$) であり、動脈硬化学会ガイドラインの LDL-C 低下目標値である 2.59 mmol/L (100 mg/dL) まで低下していなかった。*PCSK9* 変異群では血中 *PCSK9* と LDL-C 値の正相関が示された ($r=0.79$, $p=0.04$)。一方で、他の群では弱い逆相関性が見られた。Study 3 では FH 集団 ($n=36$) において、標準法の NGS では p.V4I と p.E32K が 7 人 (19%) で同定された。新たに開発した SQP ジェノタイピング法でも、感度と特異度ともに 100%で遺伝子変異を検出できた。NGS では検体の全血処理から結果を得るまでに数日を要するのに比べて、SQP ジェノタイピング法では所要時間を 1 時間以内に短縮できた。

4 研究考察

Study 1 では、*PCSK9* 機能亢進型変異と γ GT 活性の低値の関係性から、同変異が過剰な酸化ストレスの取り込みを減らす可能性が示唆された。*PCSK9*機能亢進型変異は他の FH 原因遺伝子変異 (*LDLR*, *APOB*) よりも心血管疾患リスクが低いとされており、酸化ストレスの抑制性がこの差に反映しているかもしれない。Study 2 では、コレステロール合成阻害薬投与下で *PCSK9* 変異群のみ血中 *PCSK9* と LDL-C 値の間に正相関がみられた。この正相関は同変異群では投薬中であっても依然として心血管疾患リスクが残っていることを示唆する。また、*PCSK9* による血中 LDL-C の制御が強く LDL-C の目標値に達しない *PCSK9* 変異群では、*PCSK9* 阻害薬が効果的であると示唆される。Study 3 では、高頻度な *PCSK9* 機能亢進型変異を検出できる SQP ジェノタイピング法を開発し、その意義を調べた。SQP ジェノタイピング法は、簡便な蛍光閾値の検出のみで多検体の遺伝子変異を 1 時間以内に検出することができる。日本における FH の診断率は 1%以下であり、SQP ジェノタイピング法による遺伝子スクリーニングの促進が期待できる。また、*PCSK9* 阻害薬のコンパニオン診断として、個別化医療への応用も考えられる。

5 結論

PCSK9 の機能亢進型変異では、酸化ストレスの抑制の機能を部分的に有している可能性、また治療方針の指標として活用できる可能性がある。開発した SQP ジェノタイピング法は高い処理能力と簡便性を有し、簡易遺伝子スクリーニングやクリニックでの *PCSK9* 阻害薬のコンパニオン診断法として実用的であり、臨床現場では浸透していない遺伝子検査の普及への道を拓くことが期待される。

論文審査の結果の要旨

本学位論文は3つの研究の報告から構成される。第1は高 LDL コレステロール血症患者で PCSK9 遺伝子の機能亢進型変異 p.E32K 保持者では変異なし群に比べて酸化ストレスマーカーの一つである γ GT 活性が低いことを明らかにした。FH 患者の中でも LDL-C 値が高値である割に心血管疾患リスクが低い理由の一つに関与している可能性が示唆されることを報告した。第2は、PCSK9 p.V4I 並びに p.E32K 変異保持者では、コレステロール合成阻害薬投与下でも血中 PCSK9 値と LDL-C 値の間に正相関がみられた。コレステロール合成阻害薬投与下にも関わらず LDL-C 値が十分に低下しない場合には PCSK9 変異をスクリーニングすることが PCSK9 阻害薬を追加するなど個別化医療に貢献する可能性が示唆された。第3は、日本人で比較的高頻度に認められる p.V4I 並びに p.E32K 変異を短時間で簡便に同定可能な SQP ジェノタイピング法を開発し、今後 PCSK9 阻害薬のコンパニオン診断法となることが期待された。本研究は、比較的稀な遺伝子変異を扱っていることから解析対象者が少なくデータの安定性には限界があり、今後サンプル数を更に増やした検討が必要である。第1の研究については、酸化ストレスのマーカーとして γ GT を選び、他の可能性に触れずに独善的に discussion していることに違和感を感じる。 γ GT に有意差がでた \Rightarrow γ GT 活性に影響する因子は胆汁うっ滞、薬剤などによる酵素誘導などが一般的に言われているが、酸化ストレスのマーカーという説もありその点で考察してみた、とするのが良いとの指摘があった。第2の研究については、何故 PCSK9 遺伝子変異保持者で血中 PCSK9 値と LDL-C 値の相関が保持されているかを説明したシェーマでは理解を促進するに至らず、何らかの改善が必要である。いづれにしても本学位論文を構成する研究はいずれも査読のある英文誌にアクセプトされており、学位論文の水準を満たすものとする。更に審査委員の指摘事項に従って適切に改訂があったため、合格と判断される。

試問の結果の要旨

提出された学位論文要旨に沿ってプレゼンが行われた。審査員からは以下の質問やコメントがなされた。第1の研究について酸化ストレスマーカーは数多く存在し、 γ GT のみに絞って解析を行ったのは何故か。第2の研究について何故 PCSK9 遺伝子変異保持者で血中 PCSK9 値と LDL-C 値の相関が保持されているかの説明がわかり難い。本研究は比較的稀な遺伝子変異を扱っているためにサンプル数が少なく、今後症例を増やして解析が必要であるなど、研究の限界点についても述べるべきである、などの点である。本学位論文を構成する研究はいずれも査読のある英文誌にアクセプトされており、学位論文の水準を満たしていることについては意見が一致し、上述の点について指導教官の指導の下で改善が認められるという条件で合格と判断された。