

学 位 論 文 題 名

肥大型心筋症の原因遺伝子の連鎖解析に関する研究

学位論文内容の要旨

〔緒 言〕

肥大型心筋症（hypertrophic cardiomyopathy=HCM）は、心筋肥大を来とし、重症例では、末期に心臓の拡張不全を来す原因不明の心筋疾患である。5，10年生存率はそれぞれ90，80%と報告されている。死因の過半数に突然死が占め、必ずしも予後は良好とは言えない。

HCM は半数近くの患者で家族内発生を認め、一般に常染色体優性遺伝形式をとることが判明している。近年の遺伝子工学の進歩に伴い、種々の遺伝性疾患に対し遺伝子レベルの解析が進められている。原因遺伝子が未知の場合、遺伝子座位が明らかな既知の標識遺伝子との連鎖を見つけて原因遺伝子にせまることを逆行遺伝学という。従来、多型標識遺伝子が少なく実用的ではなかったが、最近になり DNA を制限酵素によって消化したさいに生じる断片長の多型を利用した連鎖解析法（RFLP 法）により実用化された。この逆行遺伝学の手法により、Duchenne 型筋ジストロフィー、嚢胞性線維症等の遺伝性疾患の原因遺伝子が同定、単離された。最近になりハーバード大学の Seidman, C, E. を中心としたグループは、フランス系カナダ人の家族性 HCM の 2 家系で原因遺伝子が染色体14番目上の心筋ミオシン β 重鎖遺伝子の point mutation に基づくものであることを報告した。しかしながら、心筋ミオシン β 重鎖遺伝子と連鎖の無い家系も同時に報告しており、HCM の原因遺伝子について現在なお意見の一致を見ていない。

本研究では、日本人における HCM 多発家系を調査し、HCM 原因遺伝子の局在を連鎖解析を用いて検討し、新たな知見を得たので報告する。

〔対象と方法〕

Informed consent で得られた家族歴濃厚な HCM 家系を対象とした。あらかじめ用意した問診カードに従い、自覚症状、既往歴につき調査した。高血圧症（140/90mmHg）等、二次性心筋肥大を来す各種疾患は調査対象から除外した。その後、心電図検査、心エコー図検査を施行した。心エコー図検査による HCM の診断は、断層心エコー図法により非対称性中隔肥厚、心尖部肥大あるいは自由壁に限局性の明瞭な肥厚を呈するものとした。

以上より、HCM 家系、13家系103人、うち HCM と診断した患者41例を対象とした。その他、家族歴を有しない散発性 HCM 18例も対象とした。

次に、対象者の末梢血から有核細胞を分離し、さらに高分子 DNA を消化し、サザンブロッティング法によりナイロンフィルターにアルカリトランスファーする。その後、プレハイブリダイゼーション、ラベリングした DNA マーカーとのハイブリダイゼーション、ウオッシングを施行し、RFLP 判定を行った。連鎖解析判定には、コンピュータプログラム LIPED を用いた。

〔結 果〕

制限酵素 MspI により、染色体18番、18q11.2-12.1に局在する遺伝子である PALB（プレアルブミン遺伝子）を用いた場合 A 1（1.7kb）、A 2（0.93kb）の2つの対立遺伝子を認め、交叉率=0においてロッドスコア最大値3.672が得られ、HCM 原因遺伝子が PALB 領域内もしくはその近傍に存在することを強く示唆する結果が得られた。

制限酵素 BamH I により、心筋ミオシン重鎖遺伝子（pSC14）を用いた場合、多型性を認めなかった。

制限酵素 TaqI により、心筋ミオシンβ重鎖遺伝子の近傍に局在する CR1-L 436（D1426）を用いた場合、B 1（4.2kb）、B 2（2.2kb+1.8kb）の2つの対立遺伝子を認めた。対象とした13家系を連鎖解析した結果、3家系で HCM 原因遺伝子との間に交叉を認め、原因遺伝子との連鎖は否定された。

同様に、制限酵素 TaqI により CR1-L 329（D14S25）、TCRA を用いた場合、いずれのロッドスコアも最大値が-2以下となり HCM 原因遺伝子との連鎖は否定された。

〔考 察〕

日本人の家族性 HCM 家系の連鎖解析において、染色体18番に局在する PALB（プレアルブミン）をプローブとして用いた場合、最大ロッドスコア=3.672と、HCM 原因遺伝子が PALB 領域内あるいはその近傍に存在することが強く示唆される結果が得られた。PALB は甲状腺ホルモンを運搬する蛋白であるトランスサイレチンをコードする遺伝子であり、その領域内の point mutation を起因として生じる疾患としてアミロイドーシスが報告されている。アミロイドーシスは、多臓器不全を来す疾患であり、心臓障害においては、心筋肥大（心アミロイドーシス）を来すことが報告されている。しかしながら、本研究の対象となった家族性 HCM 患者については、心エコー図上、びまん性心室壁厚増大、心室壁運動低下、granular sparkle などの所見を欠き、全身の理学所見や各種血液検査所見からも、アミロイドーシスを疑わせる異常を呈さなかった。すなわち、本研究の HCM は心アミロイドーシスによる二次性心筋症の可能性は

否定的である。

一方、ハーバード大学の Seidman, C. E. らのグループは、HCM 原因遺伝子が D14S26 と極めて密接な関係を有すること、さらに、D14S26 の近傍に局在する心筋ミオシン β 重鎖遺伝子 (pSC14) 領域内に point mutation が存在する二家系を報告した。同時に、原因遺伝子が心筋ミオシン重鎖遺伝子と連鎖していない家系も報告しており、HCM が遺伝的に不均一な疾患であることを示した。

本研究において、心筋ミオシン β 重鎖遺伝子 (pSC14) を DNA プローブとして用いた場合、sporadic な HCM 患者 18 人を含めて断片長の多型性は得られず、日本人の家族性ならびに sporadic な HCM 患者において、Seidman, C. E. の報告したようなタイプの point mutation は認められなかった。

同様に、染色体 14 番目上の心筋ミオシン β 重鎖遺伝子の近傍に局在する D14S26, D14S25, TCRA の検討も加えたが、いずれの遺伝子の HCM 原因遺伝子との連鎖は認められなかった。

以上より、今回対象とした日本人の家族性 HCM の原因遺伝子に関しては、心筋ミオシン β 重鎖遺伝子領域の point mutation である可能性は低く、家族性 HCM の原因遺伝子が複数存在することが示唆された。

〔結 論〕

本研究で調査対象とした日本人の家族性肥大型心筋症 13 家系の患者ならびにその家族の連鎖解析を検討し以下の結果が明らかとなった。

- (1) 心筋ミオシン β 重鎖遺伝子との連鎖は認められなかった。
- (2) 心筋ミオシン β 重鎖遺伝子の近傍に局在する D14S26, D14S25, TCRA との連鎖は認められなかった。
- (3) HCM 原因遺伝子が PALB 領域内あるいはその近傍に局在することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕

副 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 葛 巻 暹

肥大型心筋症 (hypertrophic cardiomyopathy=HCM) は、心筋肥大を来とし、重症例では、末期に心臓の拡張不全を来す原因不明の心筋疾患である。5, 10年生存率はそれぞれ約90, 80%と報告されているが、死因の過半数に突然死が占め、必ずしも予後は良好とは言えない。成因については不明だが、HCM は約半数で家族内発生を認め、一般に常染色体優性遺伝形式をとることが判明している。本研究では、日本人における HCM 多発家系について、RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法による連鎖解析を施行し、HCM 原因遺伝子の局在を検討した。

対象者選択のため、当科でフォローしている HCM 患者のうち、今回の研究に関して、Informed consent の得られた患者およびその家族を対象とした。あらかじめ用意した問診カードに従い、自覚症状、既往歴等につき調査し、その後、心電図検査、心エコー図検査を施行した。HCM の臨床診断は、高血圧症等の二次性心筋肥大を来す疾患が無く、心エコー図検査にて、非対称性中隔肥厚、心尖部肥大あるいは自由壁に限局性の明瞭な肥厚を呈するものとした。以上の臨床診断過程より、HCM 多発家系、13家系103人、うち HCM と確定しえた患者41例を対象とした。その他、家族歴を有しない散发性 HCM 18例も対象とした。遺伝学的方法においては、患者およびその家族の末梢血から有核細胞を分離し、さらに高分子 DNA を抽出し、制限酵素により高分子 DNA を消化し、生じた断片長の多型を、アガロース電気泳動し、ナイロンフィルターにトランスファーし、染色体上の位置が決定されている各種 DNA プローブを標識後、ハイブリダイゼーションを施行した。その後、洗浄し、オートラジオグラフィーによる検出をした。連鎖解析には、ロッド得点法を用いた。

その結果、制限酵素 BamHI を用い、HCM 原因遺伝子として Seidman, C, E. らのグループが報告してる染色体14番に局在する心筋ミオシン β 重鎖遺伝子を DNA プローブとして用いた場合、散发性 HCM 18例も含め、多型性を認めなかった。制限酵素 TaqI により、心筋ミオシン β 重鎖遺伝子の近傍に局在する D1426 を DNA プローブとして用いた場合、B1 (4.2kb), B2 (2.2kb+1.8kb) の2つの対立遺伝子を認めた。対象とした家族性 HCM 13家系を連鎖解析

した結果、ロッドスコアは交叉率=0において最小値=-∞が得られ HCM 原因遺伝子との連鎖を認めなかった。さらに、心筋ミオシンβ重鎖遺伝子の近傍に局在する D14S25, TCRA の検討においても、ロッドスコアはいずれも交叉率=0において最小値が-2以下となり、HCM 原因遺伝子との連鎖を認めなかった。制限酵素 MspI により、染色体18番に局在する PALB (プレアルブミン遺伝子) を DNA プローブとして用いた場合、A1 (1.7kb), A2 (0.93kb) の2つの対立遺伝子を認めた。対象とした家族性 HCM13家系を連鎖解析した結果、ロッドスコアは交叉率=0において最大値3.672が得られ、HCM 原因遺伝子が PALB 領域内あるいはその近傍に存在することを強く示唆する結果が得られた。

以上の結果より、HCM 原因遺伝子として、Seidman, C. E. らの染色体14番の報告と異なり、染色体18番に原因遺伝子が存在することが示唆された。

口頭発表の審査会において、西教授より、多型の解析におけるアレルと HCM 患者および正常者の関連について、メンデルの法則と RFLP との関連について、さらに HCM 原因遺伝子を PALB と仮定した場合も、HCM は遺伝的に不均一な疾患である可能性の有無についての質問がなされた。葛巻教授より、PALB を DNA プローブとして用いた場合、MspI 以外の制限酵素についての多型の有無について、PALB 領域近傍の他の DNA マーカーでの検討について、さらに PALB 自身を HCM 原因遺伝子と仮定した場合の PALB の point mutation の可能性の有無についての質問がなされた。柿沼教授より、PALB を DNA プローブと選択した理由について、さらにアミロイドーシスとの鑑別についての質問がなされた。また、小林教授より、ミトコンドリアミオパチーとの鑑別についての質問がなされた。これらに対し、申請者は概ね妥当な回答を行った。その後、行われた西、葛巻両審査教授との試問においても、概ね妥当な回答がなされた。

本研究は、日本人における肥大型心筋症多発家系を対象に詳細な遺伝学的検討を行い、HCM 原因遺伝子として報告されている染色体14番と異なり、新たに染色体18番に原因遺伝子が存在する可能性を明らかにしたものであり、有意義な研究と考えられ、学位授与に値する。