

学位論文題名

日本における肥大型心筋症の遺伝学的異質性

学位論文内容の要旨

I. 背景および目的

肥大型心筋症(HCM)は原因不明の心肥大を特徴とし、それに伴う心血行動態的、電気生理学的異常を生じる心疾患である。しかし無症状に経過し突然死の剖検で初めて診断されることも多く、心突然死の重要な疾患の一つとしても知られている。よって本疾患を早期発見し突然死のhigh risk群を検出しようとする試みがなされてきた。一方HCM患者の約半数例は家族歴を有し、常染色体優性遺伝の形式を取る。これらの症例は家族性HCM(FHCM)と定義されるが、他の家系より予後の悪い家系が存在し、この違いは遺伝学的な差異によるものと考えられてきた。近年FHCMの遺伝学的原因の一つとして心筋 β ミオシン重鎖(β -MHC)遺伝子内のmissense mutationが報告され、CaucasianのHCMを対象とした調査で、FHCM患者の約30-40%に同遺伝子内のmissense mutationが関与していると報告されている。またmissense mutationの種類により予後が異なるとの報告もあり、新たな予後規定因子を決定できる可能性も示されている。しかし他の遺伝子との連鎖の報告も多く、本疾患の遺伝学的多様性が示唆されている。本邦HCM患者を対象とした調査では当科と九州大学のグループより18番染色体上のDNAマーカー“PALB”との連鎖が報告されているが、本疾患が遺伝学的多様性を持つ疾患であり、また調査した家系の規模が比較的小規模のものであることから、連鎖解析のみでは原因遺伝子の同定は困難である。また連鎖解析で有意な連鎖が出ないことは必ずしも原因遺伝子が存在しないことを意味しない。よって本研究では本邦では大規模な調査が殆どなされていない心筋 β -MHC遺伝子の異常の有無を調査することを目的とし、以下の方法で β -MHC遺伝子を調査した。また加えて最近疾患との連鎖が報告された2種類のDNAマーカーに対し連鎖解析を施行した。

II. 対象と方法

北海道大学循環器内科でフォローされ、家族歴濃厚なFHCM16家系の内患者37名、境界型10名、正常者45名、孤発例と思われる28名を対象とした。パラフィン包埋組織よりDNAを抽出した1例を除いては、末梢血有核細胞よりDNAを抽出した。primerは心筋 β -MHC遺伝子のexon3から25(計23exon)、各exonを挟むように設計し、5'末端を 32 Pでラベルした。回収したゲノムDNAをtemplateDNAとしPCRを行い、反応終了後の溶液15 μ lに

60 μ l denaturing solution(含95%formamide)を加え,加熱変性後,5%非変性ポリアクリルアミドゲル(5%のグリセロールを含む)で,0.5XのTBE bufferを使用し4-5時間,40Wで電気泳動し多型を検出した.疾患に一致して多型の認められた対象のexonはPCR産物からPCR primerをsequencing primerとし,cycle sequencing法で塩基配列を決定した. missense mutationの認められたexonに対しては正常および変異塩基配列に特異的なoligonucleotide probeを合成し,変異の認められた家系構成員PCR産物に対しdot blot hybridizationを行った.また更に,FHCM患者との連鎖が示されている1番,11番染色体上のDNAマーカーF13B,D11S916(AMF185ya1)を既報の条件で増幅し,5%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で多型を検出した.検出された多型をコンピュータプログラムLIPEDによりdisease penetrance 90%,prevalence 0.0002でlod値を算出した.各多型の頻度は,非疾患患者である配偶者24名より算出した.また本症は年齢依存性の発症様式を示すので16才以上の症例を対象とし,病歴不明な第一世代については常染色体優性遺伝形式を示すことより,いずれか一方を発症者として計算した.

III. 結果および考察

PCR-SSCP法による解析の結果,exon19,20,24にのみ疾患に一致して塩基配列の多型を認め(exon20の多型は家系XIに,exon19,24の多型は家系VIIに同時に,またexon24の多型は一孤発例にも認めた),exon24の孤発例に認められた多型はhomo-allelic,その他の多型はhetero-allelicであると考えられた.心筋 β -MHC遺伝子は計40exonよりなる遺伝子であるが,現在まで報告されたmissense mutationのほとんどは心筋 β -MHC蛋白の機能上重要な部位をコードしているexon3-25内に認められており,またこれ以外のexonにおける異常がHCMの発症に関与している決定的な証拠はない.したがってexon3-25を解析したことにより,HCMの原因となる心筋 β -MHC遺伝子の異常をほぼ確実に検出できたと考える.

これらの多型に対する直接塩基配列法による解析で,一家系(家系XI)にのみexon20内にmissense mutation(codon741: ^{Gly}GGG $\rightarrow$ ^{Arg}AGG)が認められ,dot blot hybridizationによる解析でこのmutationが患者に特異的であり,homo-allelicに生じていることが確認された.exon20は心筋 β -MHC蛋白のアクチンbinding siteをコードしており,また変異によりアミノ酸の電化がneutralからbasicに変化しており,蛋白分子の構造上,機能上大きな変化をもたらしたと考えられる.また家系XIは後述するようにPALB,F13B,D11S916とのlod値が殆ど0以下であり,本mutationがFHCMの原因と考えられた.また家系XIの患者は治療を有する不整脈を有しており,既死亡のため調査できなかった2名の患者は流出路狭窄のため心筋切除術を施行されており,アミノ酸電化の変化が予後に影響するという報告と一致した.

一方 exon19,exon24内の多型はsynonymous mutation(codon715: ^{Tyr}TAC $\rightarrow$ ^{Tyr}TAT,codon989: ^{Ile}ATT $\rightarrow$ ^{Ile}ATC)であった.このmutationはframe shiftなども生じさせず現時点ではFHCMの原因とは考えにくい,一般的な多型としては他の対象に認められなかったこと,家系内の多型の遺伝としては,全く関係のない一孤発例にも認められるこ

とから,なんらかの機序でHCM発症に関与している可能性は否定できないと考える.

以上の結果より本邦FHCMの原因として心筋 β -MHC遺伝子のmissense mutationが関与していることが判明したが,その頻度はCaucasianと比較して明らかに低いものであった.またCaucasianのFHCMで連鎖の認められたマーカーを使用しての連鎖解析でも, $\theta=0.001$ におけるlod値が-2.0以下となり完全に連鎖の否定できる家系をF13Bで3家系,AMF185ya1で4家系認め,またその他lod値が低値な家系の存在も考えあわせると,一部lod値が高値な家系も存在したが,本邦においてこれらの部位近傍に原因遺伝子を持つFHCMの割合は低いと考えられた.

しかしこのような遺伝学的異質性にも関わらず疾患として明らかな差を認めないことは興味深いことである.心肥大は病理学的検討より心筋 β -MHC蛋白の異常によって生じた二次的なものであるとする報告がある.この報告から考えると他の蛋白の異常によっても同様の病態を示す可能性がある.また本研究の対象家系にも同一家系内で心肥大の形式が異なるものがあり,心肥大には遺伝学的要因のほかに他の物理的,環境的要因が影響していることが考えられる.ただ一般的に他の要因の影響が少ないと思われる若年発症例の予後が悪いことから考えると,予後には原因となる変異蛋白の種類ではなく,蛋白の機能異常の程度が関与しているものと考えられた.

IV. 結語

- 1)FHCM16家系を対象とした調査で,心筋 β -MHC遺伝子内のmissense mutationを有した家系が1家系存在し,本邦においても心筋 β -MHC遺伝子のmissense mutationを原因とする家系が存在することが証明され,本邦におけるHCMが遺伝学的に同一の疾患でないことが示された.
- 2)心筋 β -MHC遺伝子内のmissense mutationを有した家系はCaucasianのHCMを対象とした調査と比較するとその数は明らかに低く,主たる原因遺伝子がCaucasian HCMとは異なることが示唆された.
- 3)連鎖解析上F13B,D11S916との有意な連鎖は認められず,また完全に連鎖の否定できる家系も存在したことから,これらの近傍に原因遺伝子を持つFHCMの割合は低いものと考えられた.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 安 田 慶 秀

学 位 論 文 題 名

日本における肥大型心筋症の遺伝学的異質性

I. 背景および目的

肥大型心筋症(HCM)は原因不明の心肥大を特徴とし、それに伴う心血行動態的、電気生理学的異常を生じる心疾患である。しかし無症状に経過し突然死の剖検で初めて診断されることも多く、心突然死の重要な疾患の一つとしても知られている。よって本疾患を早期発見し突然死のhigh risk群を検出しようとする試みがなされてきた。一方HCM患者の約半数例は家族歴を有し、常染色体優性遺伝の形式を取る。これらの症例は家族性HCM(FHCM)と定義されるが、他の家系より予後の悪い家系が存在し、この違いは遺伝学的な差異によるものと考えられてきた。近年FHCMの遺伝学的原因の一つとして心筋ミオシン β 重鎖(β -MHC)遺伝子内のmisense mutationが報告され、Caucasian HCMを対象とした調査で、FHCM患者の約30~40%に同遺伝子内のmissense mutationが認められると報告され、またmissense mutationの種類により予後が違ふとの報告もあり、新たな予後規定因子を決定できる可能性も示されている。しかし他の遺伝子座との連鎖の報告も多く、本疾患の遺伝学的多様性が示唆されている。本邦HCM患者を対象とした調査では当科と九州大学のグループより18番染色体上のDNAマーカー“PALB”との連鎖が報告されているが、本疾患が遺伝学的多様性を持つ疾患であり、また調査した家系の規模が比較的小規模のものであることから、連鎖解析のみでは原因遺伝子の同定は困難である。また連鎖解析で有意な連鎖が出ないことは必ずしも原因遺伝子が存在しないことを意味しない。よって本研究では本邦では大規模な調査が殆どなされていない心筋 β -MHC遺伝子の異常の有無を調査することを目的とし、以下の方法で心筋 β -MHC遺伝子を調査した。また加えて最近疾患との連鎖が報告された2種類のDNAマーカーに対し連鎖解析を施行した。

II. 対象と方法

北海道大学循環器内科でフォローされ、家族歴濃厚なFHCM16家系の内患者37名、境界型10名、正常者45名、孤発例と思われる28名を対象とした。パラフィン包埋組織よりDNAを抽出した1例を除いては、末梢血有核細胞よりDNAを抽出した。現在までmissense mutationは全て心筋 β -MHC蛋白のheadからhead-rod junction部をコードするexon内に認められている。よって本研究ではheadからhead-rod junction部をコードしているexon3-25を各々PCR法にて増幅し、加熱変性後、5%非変性PAGE(5%のグリセロールを含む)で電気泳動し、一本鎖高次構造多型(SSCP)を検出した。疾患に一致して認められた多型はPCR産物から直接cycle sequence法で塩基配列を決定した。missense mutationの認められたexonに対しては正常および変異塩基配列に特異的なoligo probeを合成し、missense mutationの認められた家系構成員に対しdot blot hybridization analysisを行った。また更に、

FHCM患者との連鎖が報告されたDNAマーカーF13B(1q),D11S916(11p-q)を既報の条件で増幅し、5%変性PAGE電気泳動で多型を検出した。検出された多型と疾患との連鎖をコンピュータープログラムLIPEDによりdisease penetrance 90%,disease prevalence 0.0002でlod値を算出した。

III. 結果および考察

PCR-SSCP法による解析の結果,exon19,20,24にのみ,疾患に一致して塩基配列の多型が認められた(exon20の多型は家系XIに,exon19,24の多型は家系VIIに同時に,またexon24の多型は一孤発例に)。PCR-SSCP法上はexon24の孤発例に認められた多型はhomo-allelic,その他の多型はhetero-allelicであると考えられた。これらの多型に対する直接塩基配列決定法による解析で,一家系(家系XI)にのみexon20内にmissense mutation(codon741:GlyGGG→ArgAGG)が認められ,dot blot hybridizationによる解析でこのmutationが患者に特異的であり, hetero-allelicに生じていることが確認された。exon20は心筋 β -MHC蛋白のアクチンbinding siteをコードしており,また変異によりアミノ酸の電化がneutralからbasicに変化しており,HCMの発症に関与したと考えられた。一方exon19,exon24内の多型はsynonymous mutation(codon715:TyrTAC→TyrTAT,codon989:IleATT→IleATC)であった。このmutationはframe shiftなども生じさせず現時点ではFHCMの原因とは考えにくい,一般的な多型としては他の対象に認められなかったこと,家系内の多型の遺伝としては,全く関係のない一孤発例にも認められることから,なんらかの機序でHCM発症に関与している可能性は否定できないと考えた。またCaucasian FHCMで連鎖の認められたマーカーを使用し連鎖解析でも, $\theta=0.001$ におけるlod値が-2.0以下となり完全に連鎖の否定できる家系をF13Bで3家系,D11S916で4家系認め,またその他lod値が低値な家系の存在も考えあわせると,本邦においてこれらの部位近傍に原因遺伝子を持つFHCMの割合は低いと考えられた。

以上の結果より日本人HCM患者の一部が,心筋 β -MHC遺伝子内のmissense mutationを有することが判明したが,その存在率はCaucasian HCMと比較すると16家系中1家系と明らかに低く,また連鎖解析上もF13B,D11S916との連鎖傾向はみとめられず,日本人HCMとCaucasian HCMとは主たる原因遺伝子が異なることが示唆された。

口頭発表の審査会において葛巻教授よりmissense mutationの結果生じる変異蛋白質の機能上,構造上の解析について,今回調査を行わなかったexon26-40およびintron内の変異の可能性の有無について,他の心筋収縮蛋白異常とHCM発症との関与の可能性について質問がなされた。また安田教授より孤発例の遺伝学的意味,遺伝子診断への応用の可能性について質問がなされたが,これらに対し申請者は概ね妥当な回答を行った。その後,行われた葛巻,安田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。

本研究では日本人肥大型心筋症患者を対象に詳細な遺伝学的検討を行い,日本人HCMの原因の一つとして,心筋 β -MHC遺伝子のmissense mutationを同定した。また同時に日本人HCMにおいて,同遺伝子のmissense mutationの存在率が低いことを示し,加えて連鎖連鎖の結果よりCaucasian HCMと主たる遺伝学的原因が異なる可能性を示したものであり,有意義な研究と考えられ,学位授与に値する。