

Angiotensinogen gene polymorphism in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy

（肥大型心筋症におけるアンジオテンシノーゲン遺伝子多型症について）

学位論文内容の要旨

【背景】左室肥大は、高血圧症、大動脈弁狭窄症などの pressure overload やカテコラミン、アンジオテンシン II などの液性因子などによって発症、進展することが知られている。一方、肥大型心筋症(HCM)は遺伝的透過性の高い疾患であり、心筋構造蛋白であるミオシン重鎖、トロポニン T などの遺伝子異常の関与が多く報告されている。欧米では、その割合は 30 から 50%と考えられているが、日本人では、ミオシン重鎖、トロポニン T の遺伝子変異が欧米ほど多くないことから、強力な昇圧系であるレニン-アンジオテンシン系 (RAS) における遺伝子多型性との関連が着目されており、我々はこれまでにアンジオテンシン変換酵素遺伝子と HCM の関連について報告している。さらに最近、レニン基質であるアンジオテンシノーゲン遺伝子が、心筋梗塞や心肥大などの心疾患と関連することが報告され、心肥大の進展への関与について研究されている。

【目的】今回、我々は、HCM とレニン-アンジオテンシン系の関連をさらに明らかにする目的で、HCM 患者、およびその健常家族において、アンジオテンシノーゲン遺伝子多型性を検討した。

【方法】対象：対象は心エコー検査を施行し、HCM と診断された患者『全 HCM 患者群』96 名とその家族歴を有する健常者『健康家族群』105 名及びコントロール群 160 名の計 361 名。これらを同一家計内複数発症を認める家族性 HCM 患者群 (FHCM 群) と家族内発症を認めない孤発性 HCM 患者群 (SHCM 群) に分類し、家族歴聴取、血圧測定、心電図検査を施行した。以上の操作によって分類したの各群間でアンジオテンシノーゲン遺伝子多型の 3 通りの genotype の出現比率に属する人数を調べ比較した。

統計は χ^2 (カイ二乗検定) を用い、5%の危険率で各群間の独立性を検定した。HCM 発症におけるアンジオテンシノーゲン T/M 遺伝子多型の関与と評価するため、オッズ比と 95%信頼区間は健康家族群の低い危険率を元に算出された。さらに我々は危険率のベースラインを求めるために健康家族群を用い、TT 多型による危険率と同様に T allele の関与についても検討した。

分析方法：遺伝子 DNA は、白血球細胞核より抽出した。アンジオテンシノーゲンの T174M および M235T 塩基置換部位はエクソン 2 に存在しているため、エクソン 2 及びイントロン 2 に相補的なプライマーを用い、polymerase chain reaction (PCR) 法によりエクソン 2 断片を増幅した。

制限酵素 SfaNI 処理することにより、266 塩基対に断片化される PCR 産物 (M235) と、断片化されずに 303 塩基対のもの (T235) に分けられ、各群間でアンジオテンシノーゲン遺伝子について TT 遺伝子型, MT 遺伝子型, MM 遺伝子型に分類した。なお、操作に伴うコンタミネーション防止のため、サンプル DNA とプライマー以外のすべての試薬には紫外線照射を行い、更に PCR の際にはサンプル 5 本につき 1 本のブランクをおいて分析した。

【結果】各群の間で、年齢、血圧に有意差を認めなかった。心エコー図法上、FHCM 群と SHCM 群間においては、左室最大壁厚について差を認めず、また肥大の形態についても偏りを認めなかった。アンジオテンシノーゲン遺伝子 TT, MT, MM はそれぞれ、肥大型心筋症と健常家族の男性の 66%、33%、1% に対し、女性の 63%、32%、4% に認められ、有意差はなかった。

アンジオテンシノーゲン遺伝子の 3 つの遺伝子型; TT, MT, MM の出現パターンを比較した場合も、TT 遺伝子型の発現頻度が SHCM 群において高く、コントロール群の間に、有意差を認めた。FHCM 群においては、コントロール群の間に差を認めなかった。遺伝子型比率は健常家族の Hardy-Weinberg 式に従っており ($\chi^2=0.4$)、コントロール群と同様であった ($\chi^2=1.7$)。

オッズ比 (HCM と TT 遺伝子型、MT 遺伝子型、MM 遺伝子型の間の相対危険率の検定) は HCM 群で 1.5 (95% 信頼区間 0.9~2.8, $\chi^2=2.1$)、FHCM 群で 1.1 (95% 信頼区間 0.5~2.3, $\chi^2=0.1$) そして SHCM 群で 2.1 (95% 信頼区間 1.0~4.3, $\chi^2=3.9$, $p<0.05$) であった。FHCM 群と SHCM 群のアンジオテンシノーゲン T/M 遺伝子型の間には有意差を認めなかった。

各群間のアンジオテンシノーゲン遺伝子多型の分析結果によって、肥大のない健常家族群の T allele 頻度は 0.78 であり、コントロール群と同様であった。全 HCM 群も 0.80 でほぼ同様の T allele 頻度を認めた。SHCM 群の T allele 頻度は高い値を示し (88% vs 78%, $\chi^2=6.0$, $p<0.025$)、コントロール群との間に有意差を認めた。健常家族群の兄弟と子孫との間の T allele 頻度は、高血圧及び左室肥大を認めないコントロール群でのそれと同様であり (78% vs 78%) 有意差を認めなかった。健常家族群の兄弟と子孫の M allele 頻度は SHCM 群患者よりも高率であった (23% vs 12%, $\chi^2=4.6$, $p<0.05$)。

【討議、結論】アンジオテンシノーゲン遺伝子多型と HCM の関連について検討した結果、T allele 頻度と TT 遺伝子型の出現パターンについて家族内発症を認めない sporadic HCM 群において相関を認めた。アンジオテンシノーゲン遺伝子は、HCM (特に孤発例において) における心肥大形成に重大な役割を担うと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和

副 査 教 授 北 畠 顕

副 査 教 授 岸 玲 子

学 位 論 文 題 名

Angiotensinogen gene polymorphism in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy

(肥大型心筋症におけるアンジオテンシノーゲン遺伝子多型症について)

肥大型心筋症(HCM)は遺伝的透過性が高く、約半数の症例において家族内発症が認められ、さらにその半数において心筋構造蛋白であるミオシン重鎖、トロポニン T などの心筋サルコメア構成たんぱく質に遺伝子変異が見い出される。しかし、HCM の半数は責任遺伝子の明らかではない孤発症例であり、日本人では、ミオシン重鎖、トロポニン T の遺伝子変異は欧米ほど多くはないこと、また、疾患発症は成人例が多いことからサルコメア構成たんぱく質以外に発症あるいは進展関連遺伝子の存在することが示唆されていた。申請者は、心肥大とレニン・アンジオテンシン系との強い相関性に着目し、中でも、レニン基質であるアンジオテンシノーゲン遺伝子が、心肥大と関連するとの報告に基づき本研究に着手した。すなわち、本研究は HCM へのレニン・アンジオテンシン系の関与を明らかにする目的で、HCM 患者、およびその健常家族において、アンジオテンシノーゲン遺伝子多型性を検討したものである。対象は心エコー図検査を施行し、HCM と診断された患者【全 HCM 患者群】96 例と心肥大を有しない家族【健常家族群】105 例及び【全 HCM 患者群】と性、年齢をマッチさせた健常者コントロール群 160 例の計 361 例である。【全 HCM 患者群】は同一家系内複数発症者を認める家族性 HCM 患者群(FHCM 群)と家族内発症を認めない孤発性 HCM 患者群(SHCM 群)に分類し、家族歴聴取、血圧測定、心電図検査、心エコー図検査を施行した。以上の操作によって分類した各群間でアンジオテンシノーゲン遺伝子多型の 3 通りの genotype の出現比率と臨床上の指標とを比較検討した。遺伝子 DNA は、白血球細胞核より抽出した。アンジオテンシノーゲンの T174M および M235T 塩基置換部位はエクソン 2 に存在しているため、エクソン 2 及びイントロン 2 に相補的なプライマーを用い、polymerase chain reaction (PCR) 法によりエクソン 2 断片を増幅した。制限酵素 SfaN I 処理することにより、266 塩基対に断片化される PCR 産物 (M235) と、断片化されずに 303 塩基対のもの (T235) に分け、各群間でアンジオテンシノーゲン遺伝子について TT 遺伝子型、MT 遺伝子型、MM 遺伝子型に分類した。その結果、アンジオテンシノーゲン遺伝子 T アレル頻度及び TT 遺伝子型の頻度は Hardy-Weinberg 式に従ったことが示されている。その際、肥大のない健

常家族群の T allele 頻度は 0.78 であり、コントロール群と同様で差を認めなかった。しかし、SHCM 群において T アレル頻度及び TT 遺伝子型の頻度が高く、健常家族群及びコントロール群の間に有意差を認めた。申請者は、さらに HCM と TT 遺伝子型、MT 遺伝子型、MM 遺伝子型の間の相対危険率の検定するため、オッズ比を用いて HCM 群で 1.5、FHCM 群で 1.1 そして SHCM 群で 2.1 であることを示した。しかし、FHCM 群と SHCM 群のアンジオテンシノーゲン T/M 遺伝子型の間には有意差を認めなかった。以上の結果から、申請者はアンジオテンシノーゲン遺伝子が、HCM、特に孤発例において、心肥大形成に重大な役割を担うと結論している。

学位論文の公開発表に際して副査の岸教授から、孤発性肥大型心筋症と家族性肥大型心筋症との本質的な違い、予防医学的な立場から方法論としての遺伝子多型性の検討の意義、ことに申請者によるレニン・アンジオテンシン系遺伝子多型性の意義と将来展望について、副査の北畠教授から、孤発性肥大型心筋症と家族性肥大型心筋症との肥大様式の違い、遺伝子多型性の違いが肥大様式へも影響しうるか否かについて、また、アンジオテンシノーゲン遺伝子 T アレルの人種間の違いと T アレル頻度の病態的意義について、また、主査の川上教授からはアンジオテンシノーゲン遺伝子 T アレル頻度と血清アンジオテンシノーゲン濃度との関係について、さらに、今回明らかにされたアンジオテンシノーゲン遺伝子と孤発性肥大型心筋症の関係の遺伝学的意義と家族性肥大型心筋症ですでに明らかにされている責任遺伝子との意義の違いについて質問がなされた。申請者は研究結果に基づいて、あるいは、文献的知識を駆使して、誠実にかつ、概ね適切に回答し得た。

肥大型心筋症(HCM)の発症あるいは進展に関連する遺伝子として、レニン・アンジオテンシン系、ことにアンジオテンシノーゲン遺伝子との関連性を明らかにした本研究は、原因の必ずしも明らかではない肥大型心筋症の成因、発症機転の解明に重要な寄与をしうるものと評価される。

審査員一同は、申請者の豊富な学識に併せて、この研究が肥大型心筋症研究の進展に与える成果を評価し、申請者が博士（医学）を受けるに十分な資格を有するものと判定した。