

原 著

重複遺伝子変異を伴った家族性肥大型心筋症 家系における表現型の多様性

¹⁾東京女子医科大学 医学部 循環器小児科 (指導: 中澤 誠教授)²⁾国際医療福祉大学 保健学部 放射線・情報科学科³⁾九州厚生年金病院 小児科アライ ショウイチ マツオカル ミコ フルタニ ミチコ ジョウオ クニタカ ナカザワ マコト
新井 正一¹⁾²⁾・松岡瑠美子¹⁾・古谷 道子¹⁾・城尾 邦隆³⁾・中澤 誠¹⁾

(受付 平成 13 年 6 月 16 日)

Phenotypic Variation of Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Caused by Combined Missense Mutations

Shoichi ARAI¹⁾²⁾, Rumiko MATSUOKA¹⁾, Michiko FURUTANI¹⁾,
Kunitaka JOH-O³⁾ and Makoto NAKAZAWA¹⁾¹⁾Department of Pediatric Cardiology (Prof. Makoto NAKAZAWA),
Tokyo Women's Medical University, School of Medicine²⁾Department of Radiological Sciences, School of Health Science, International University of Health and Welfare³⁾Department of Pediatrics, Kyushu Welfare and Pension Hospital

Although mutations of sarcomere protein genes and mitochondrial DNA (mtDNA) cause familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC), the phenotypic expression varies in patients who harbor not only a different disease gene mutation, but also the same one. To investigate phenotypic variability in FHC patients, we analyzed the clinical findings, and performed mutation analysis of the cardiac β -myosin heavy chain (β -MHC) gene, the cardiac troponin T (Tn-T) gene and mtDNA in patients of two FHC families. In all five patients of family A, we found the β -MHC gene mutation (Gly741Trp) and mtDNA mutation (T3394C). In four patients of family B, in addition to the β -MHC gene mutation (Gly741Trp) which we reported previously, the rare polymorphic Tn-T gene mutation (Lys253Arg) was detected in an affected son and unaffected father. Also, nine polymorphic mtDNA missense mutations were found in the affected son and an affected daughter. Especially, six out of nine mutations were found to locate at evolutionarily conservative regions. Coexistence of other genetic abnormalities in β -MHC linked FHC, such as multiple polymorphic mtDNA mutations, may contribute to varying phenotypic expression and explain the heterogeneous behavior of FHC.

緒 言

肥大型心筋症は、心筋細胞の錯綜配列を伴う左室の異常肥大を起す心筋疾患であり、形態学的特徴は左室壁、特に心室中隔の肥大が著しく、非

対称性中隔肥大を示すことが特徴の一つである。また本症の半数以上で家族内発症を認め¹⁾、その多くが単純優性遺伝の形態をとり、1年間でそのうちの2~4%の割合で突然死をきたすことが報

告されている²⁾³⁾。また、特に若年発症例や家族歴のある症例の予後が悪いことが知られており、若年者における突然死の多くを占める点で重要な疾患である^{4)~6)}。

肥大型心筋症患者の心筋 β ミオシン重鎖(β -MHC)遺伝子の異常が1990年に報告され⁷⁾、以来、今までにサルコメア構成蛋白をコードする9種類の疾患遺伝子が明らかにされている^{7)~14)}。遺伝子異常が認められた家系を詳細に検討することにより、疾患遺伝子の種類や遺伝子変異の部位により表現型が異なることが明らかにされてきている¹⁵⁾。肥大型心筋症において臨床的所見を検討してみると、同一遺伝子の同一部位に変異を持っている患者でも、高齢になるまで心肥大を呈さない場合から、若年で心筋症が発症する場合までいろいろな表現形態を示すことが報告されている¹⁴⁾。そのため遺伝学的要因を含めた新たな疾患予後規定因子が存在する可能性が示唆されている。

またミトコンドリア遺伝子(mtDNA)変異が心筋症^{16)~18)}をはじめ、脳筋症¹⁹⁾²⁰⁾、難聴²¹⁾、糖尿病²²⁾などの疾患へ関与することが近年の分子生物学の進歩に伴い解明されてきた。ミトコンドリアはエネルギーを作り出す細胞内小器官であり、全身の細胞に存在する。各組織では細胞エネルギー依存度によってミトコンドリアの数に違いがあり、ミトコンドリアの機能が低下するとエネルギーを多く必要としている細胞が最初に障害を受けやすい。心臓はエネルギー依存度が高く、ミトコンドリアの機能が低下することにより影響を受けやすい。

我々はこれらのことから、肥大型心筋症の表現型を規定する因子を検討するために、肥大型心筋症2家系(A家系, B家系)の臨床所見ならびにサルコメア構成蛋白のうち、多くの変異が報告されている β -MHC遺伝子(B家系 Gly741Trp は既に報告済)²³⁾、トロポニンT(Tn-T)遺伝子およびmtDNAにおける変異の検索を行い、その結果を検討した。

対象および方法

1. 対象

共に3世代で肥大型心筋症が発症、または肥大

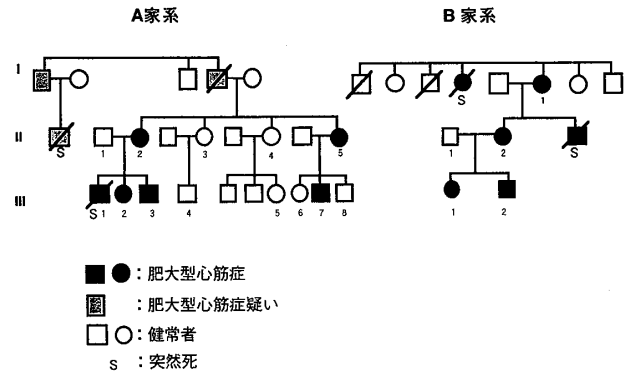


図1 肥大型心筋症家系2家系(A家系, B家系)の家系図
2家系共に3世代で肥大型心筋症が発症している。

型心筋症と診断されていないがその疑いのある者を含む肥大型心筋症家系2家系(A家系, B家系)を対象とした。この2家系の家系図を示す(図1)。本研究に際して、患者ならびにその家族からインフォームドコンセントを得ている。この2家系の患者およびその家族において12誘導心電図(ECG)、2D心臓エコーを行った。

A家系のIII-1は、肥大型心筋症が確認されたのち、学校で疾走中に突然死を起こしたケースのため、遺伝子検索は施行していない。また患者II-5は、現在52歳であるが、先天性股関節亜脱臼のため20歳まで運動制限がされていた。ごく最近まで心肥大も認められず自覚症状もなく過ごしてきたが、今回、 β -MHC遺伝子に変異が見つかったため再度心臓エコーを施行した結果、肥大型心筋症が確認されたケースである。この家系内において、肥大型心筋症を確認した6名中4名(II-2, 5, III-2, 7)にトレッドミル検査を行った。その結果、4名全員に運動負荷後回復期に、U波の出現によるQTUの延長を認めた。

2. 心筋 β ミオシン重鎖(β -MHC)遺伝子の解析

患者およびその家族より10mlのヘパリン加採血後、リンパ球分離を行い、そのうち半分より直接DNAを抽出した。残り半分よりEpstain Barr virusを用いてリンパ球の株化を行った。株化したリンパ球よりmRNAを抽出し、今までに点突然変異が報告されている β -MHC遺伝子のエクソン3~24の領域を増幅できるよう3セットのプラ

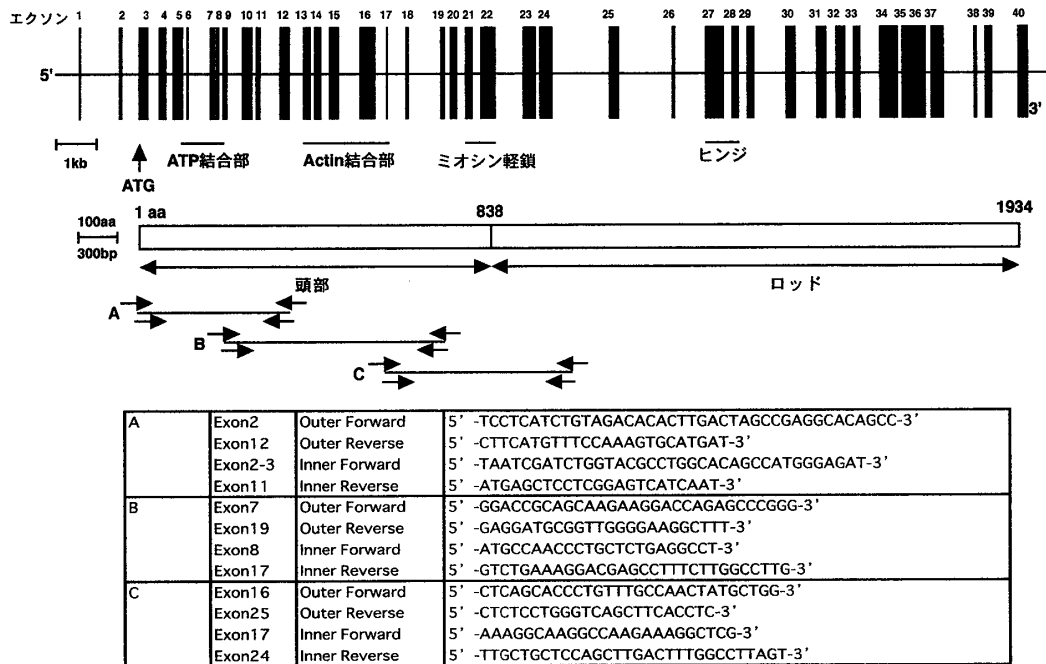


図2 β-心筋ミオシン重鎖遺伝子における検索した3領域A, B, C (上段) と使用したプライマーの一覧 (下段)

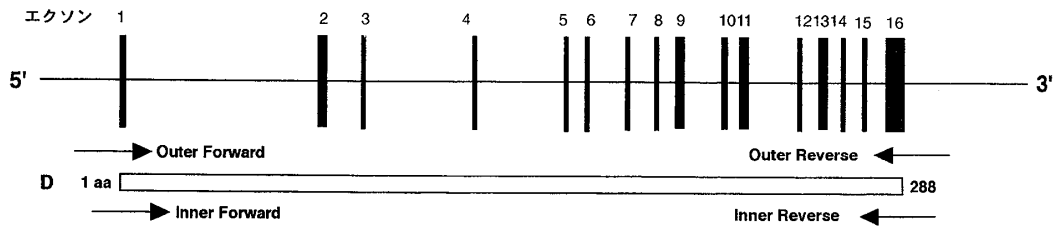
イマーを作製し, RT-PCR法 (RNAより reverse transcriptase を用いて cDNA を作製し, これを鋳型にして PCR を行う方法) で cDNA を増幅した. まず図2に示したアウターリバープライマーで mRNA を鋳型として cDNA を作製し, 次にアウターフォワードプライマー 0.5μM に 2.5 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTP) (Takara) 7 μl, 10mM TRIS-hydrochloric acid, 1.5mM magnesium chloride, 0.001% (wt/vol) のゼラチンを加えた. RT-PCR の条件は, 熱変性を 94°C 6分で行い, その後 0.5μl の TaqDNA ポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus) を加え, 94°C 45秒, 55°C 2分, 72°C 2分を 35 サイクル行い, 伸長反応 72°C 10分を行った. 次に, この反応で得られた PCR 産物を テンプレート (50ng) としてセカンド PCR を行った. 使用したインナープライマーを図2に示す. このほかの PCR 反応の条件は 1 回目と同一で行った. その PCR で増幅された cDNA をサブクローニングし, シーケンサー (ALF DNA Sequencer II Pharmacia LKB) で塩基配列の決定を行った.

3. 心筋トロポニン T (Tn-T) 遺伝子の解析

全長 (エクソン 1~16) を増幅できるようにプライマーを作製し, 株化細胞 mRNA を用いた RT-PCR 法による Tn-T 遺伝子の増幅を行った. 使用したプライマーの位置とデザインを図3に示す. 反応系は β-MHC 解析の場合と同様の方法を用いた. RT-PCR の条件は, 熱変性を 94°C 6分で行い, その後 0.5μl の TaqDNA ポリメラーゼを加え, 94°C 45秒, 55°C 2分, 72°C 2分を 35 サイクル行い, 伸長反応 72°C 10分を行った. 次に増幅された cDNA をサブクローニングし, シーケンサーで塩基配列の決定を行った.

4. ミトコンドリア遺伝子 (mtDNA) の解析

mtDNA (16,569bp) を 9 領域に分けるようなプライマーをデザインした (表1). このプライマーと細胞株化 DNA を用いて PCR 法で mtDNA の増幅を行った. 15mM MgCl₂ が含まれた 10×PCR バッファー (Perkin Elmer) 10μl, dNTP (TOYOBO) 8μl, 各プライマー 0.5μM, テンプレート (DNA 50ng), dd-H₂O 70.5μl を加えた. PCR の条件は熱変性を 94°C 6分で行い, その後 0.5μl の TaqDNA ポリメラーゼを加え, 94°C 15秒, 55°C 15秒, 72°C 40秒を 30 サイクル行い, 伸長反応 72°C 10分を



Exon1	Outer Forward	5'-AGAGCAGAGACCATGTCTGACATA-3'
Exon1	Inner Forward	5'-GCAGGTGCGAGCGAGGAGCAGATC-3'
Exon16	Inner Reverse	5'-ACCATGTCTGACATAGAAGAGGTG-3'
Exon16	Outer Reverse	5'-TTTGGTGAAGGAGGCCAGGCTCTA-3'

図3 心筋トロポニン T 遺伝子における検索した領域(エクソン 1~16) (上段) と使用したプライマーの一覧 (下段)

表1 ミトコンドリア DNA のプライマー

領域	プライマー名	塩基番号		プライマーの塩基配列
A	mt-5F	nt41-60	Forward	5'-CTCCATGCATTTGGTATTTT-3'
	mt-5R	nt3460-3441	Reverse	5'-CGTCAGCGAAGGGTTGTAGT-3'
B	mt-1F	nt3171-3190	Forward	5'-CCGTAAATGATATCATCTCA-3'
	mt-1R	nt4640-4621	Reverse	5'-GATGGCAGCTTCTGTGGAAC-3'
C	mt-6F	nt4341-4360	Forward	5'-GAATCGAACCCATCCCTGAG-3'
	mt-6R	nt5980-5961	Reverse	5'-GCTCATGCGCCGAATAATAG-3'
D	mt-3F	nt5681-5700	Forward	5'-CAAACACTTAGTTAACAGCT-3'
	mt-3R	nt9110-9091	Reverse	5'-ATTGTGAAGATGATAAGTGT-3'
E	mt-4F	nt8531-8550	Forward	5'-ACGAAAAATCTGTTTCGCTCA-3'
	mt-4R	nt10210-10191	Reverse	5'-AAAGGGACGCGGGCGGGGA-3'
F	mt-7F	nt9891-9910	Forward	5'-TCCAAACATCACTTTGGCTT-3'
	mt-7R	nt12870-12801	Reverse	5'-CTCGGGCGTATCATCAACTG-3'
G	mt-8F	nt12501-12520	Forward	5'-GTGCCTAGACCAAGAAGTTA-3'
	mt-8R	nt15140-15121	Reverse	5'-CATAGCCTATGAAGGCTGTT-3'
H	mt-9F	nt14821-14840	Forward	5'-CAACATCTCCGCATGATGAA-3'
	mt-10R	nt15960-15941	Reverse	5'-TCTGATTTGTCCTTGAAAA-3'
I	mt-11F	nt15691-15700	Forward	5'-AATATTTGCCCCACTAAGCC-3'
	mt-11R	nt340-321	Reverse	5'-GTGTTTAAGTGCTGTGGCCA-3'

行った。得られた各 PCR 産物を用い、シーケンサーで塩基配列の決定を行った。

5. 制限酵素断片長多型による変異の解析

mtDNA のうち、点突然変異が確認された塩基番号 3394 部分を挟むようなプライマー 5'-CCGTAAATGATATCATCTCA-3'、5'-CGTCAGCGAAGGTTGTAGT-3' を使用し、株化細胞から抽出した DNA を PCR 法で増幅を行った。この増幅 DNA に制限酵素 (Hae III) を作用させ、15% アク

リルアミドゲル電気泳動法により DNA 切断の有無を確認した。

なお、PCR で認められた変異を確定するために、それぞれ血液から直接抽出した DNA を用いて確認した。

結 果

A 家系

臨床所見で、患者 6 名 (II-2, 5, III-1, 2, 3, 7) のうち 5 名 (III-1 は突然死のため未測定) の心臓エ

表2 A家系における臨床所見, 心エコー所見, 発症年齢, 遺伝子検索

患者	年齢(歳) /性	臨床所見	心エコー所見				発症年齢 (歳)	遺伝子変異		
			PWT (mm)	IVST (mm)	SAM	ASH		β -MHC Gly741Trp	Tn-T Lys253Arg	mtDNA Tyr3394His
II-2	61/女	肥大型心筋症	9	14	-	+	47	+	-	+
III-1	13/男	肥大型心筋症, 突然死	NA	NA	NA	NA	12	NA	NA	NA
III-2	36/女	肥大型心筋症	9	13	+	+	11	+	-	+
III-3	29/男	閉塞性肥大型心筋症	11	26	+	+	7	+	-	+
II-5	52/女	肥大型心筋症	7	12	-	-	50	+	-	+
III-7	26/男	閉塞性肥大型心筋症	14	30	+	+	13	+	-	+

PWT: posterior wall thickness 後壁厚, IVST: interventricular septal thickness 心室中隔厚, SAM: systolic anterior motion 収縮期前方運動, ASH: asymmetric septal hypertrophy 非対称性心室中隔肥大, NA: not analyzed 未測定, β -MHC: cardiac β -myosin heavy chain gene 心筋 β ミオシン重鎖遺伝子, Tn-T: cardiac troponin T gene 心筋トロポニンT遺伝子, mtDNA: mitochondrial DNA ミトコンドリア遺伝子.

コー所見で著明な心筋の肥大が認められた(表2). 家系内12名の β -MHC遺伝子の検索を行った結果, 患者全員(II-2, 5, III-2, 3, 7)に β -MHC遺伝子にミスセンス変異(Gly741Trp, エクソン20)を認め(図4-1), 健常者(II-1, 3, 4, III-4, 5, 6, 8)では変異は認められなかった.

遺伝子変異を認めた5名(26~61歳)の患者における臨床所見をさらに詳しく検討してみると, 心臓エコーで後壁厚(posterior wall thickness: PWT)は7~14mm, 心室中隔厚(interventricular septal thickness: IVST)は12~30mmと患者間の値にばらつきがみられ, 収縮期前方運動(systolic anterior motion: SAM)や非対称性心室中隔肥大(asymmetric septal hypertrophy: ASH)の出現も患者間で差がみられた. 発症年齢についても7~50歳で, また, 表現型も肥大型心筋症, 閉塞性肥大型心筋症と同一家系内で違いがみられた.

同一家系内で同一の遺伝子変異があるにもかかわらず表現型に差がみられたため, III-2のmtDNA(16,569bp)の全塩基配列を決定し, ケンブリッジシーケンス²⁴⁾と比較, 解析を行った. その結果, 29カ所の変異部位が確認され, そのうち疾患と関係がある塩基番号3394でTからCの変異が認められ, チロシンからヒスチジンのアミノ酸が置換していた(図4-2). 制限酵素HaeIIIを使った制限酵素断片長多型を確認した結果, 健常であるII-1以外は肥大型心筋症患者を含む全ての人

(II-2, 3, 4, 5, III-2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)に変異が確認された.

A家系におけるTn-T遺伝子に変異は認められなかった.

B家系

患者全員の β -MHC遺伝子にA家系と同じGly741Trpの変異(既に報告済²³⁾)を認めた.

A家系同様, 患者4名(26~71歳)全員の臨床所見をさらに詳しく検討してみると, 心臓エコー所見でPWTは7~9mm, IVSTは14~29mmと個々の値に差がみられた. また発症年齢も9~51歳と差があり(表3), 世代が下がるに従って若年齢で発症が確認された. 表現型も, 肥大型心筋症, 閉塞性肥大型心筋症と同一家系内で違いがみられた.

B家系患者全員で同一の β -MHC遺伝子変異があったにもかかわらず臨床所見にばらつきがみられるため, さらにTn-T遺伝子の検索を行った結果, III-2(患者)とII-1(症状を伴わない父親)のTn-T遺伝子に正常者の1~2%に認められる稀な多型変異(Lys253Arg, エクソン14)を確認した(図5).

さらに, III-1, 2におけるmtDNAの全塩基配列の解析を行った. その結果, 両者の変異が一致した部位が35カ所あった. そのうちの9カ所がアミノ酸置換を伴うミスセンス変異で, 他はアミノ酸置換を伴わないサイレント変異で, 今まで報告の

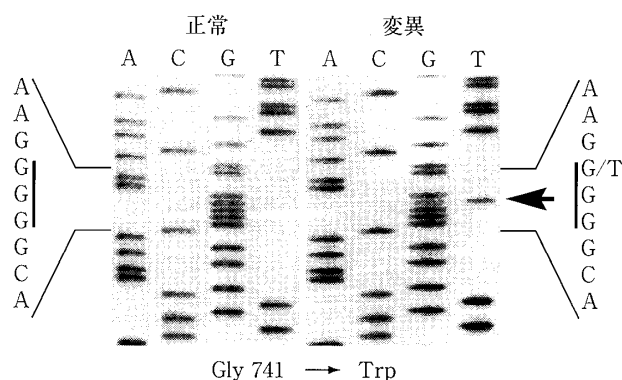
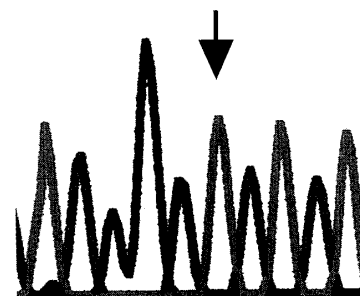


図4-1 A家系, B家系共に肥大型心筋症患者全員にβ-心筋ミオシン重鎖遺伝子 Gly741→Trp (エクソン20) にミスセンス変異を認めた。

TAGGC TATAT

正常



ある疾患と関係のある変異は存在しなかった。その結果を表4に示す。

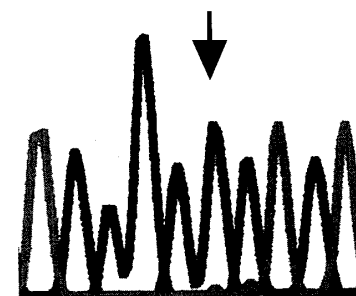
したがって、アミノ酸置換を伴う9カ所の変異部位をジーンバンク (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/blast/Blast.cgi>) に登録されているヒト以外の属、種の mtDNA データと比較検討した。9カ所のミスセンス変異のうち2カ所 (塩基番号14199, 14272) は異属種と一致する部位がなく、残り7カ所の変異部位では属、種間における相同性が高いことが確認された (図6)。特に塩基番号5178 (ND2 領域), 8860 (ATP6 領域), 9667 (CO3 領域) は種を超えて完全に保存されている部分であった。また、塩基番号10398 (ND3 領域), 11447 (ND4 領域), 15326 (cyt b 領域) は図6に示すごとく、よく保存されていた。また、塩基番号9559 (CO3 領域) はヒト以外の種ですべて一致しており、高い相同性を示していた。

考 察

今回検討を行った A, B 家系の患者全員にみられたサルコメア収縮蛋白をコードする遺伝子の一つである β-MHC の遺伝子 Gly741Trp 変異部位は、β-MHC 蛋白の頭部からロッドの接合部位に位置し、心筋の収縮に関与する actin II 結合部の近傍に位置しており、筋肉の収縮の際にきわめて重要な部位である。この部位は種を越えて確実に保存されており²⁵⁾、この変異が β-MHC 蛋白の機能に大きな影響を与えていると考えられている。またこの変異 (Gly741Trp) は、我々²³⁾のほかに、日

TAGGC CATAT

変異



T3394C Tyr → His

図4-2 ミトコンドリア遺伝子 (16,569bp) の全塩基配列の解析をした結果, A家系で塩基番号3394においてTからCの変異が認められた。この結果, チロシンからヒスチジンへのアミノ酸置換が確認された。

本では木村ら²⁶⁾が報告している。いずれも変異を有した者は全て肥大型心筋症を発症している。また同一部位で、アミノ酸置換の異なる変異 (Gly741 Arg) が報告されている。この変異については日本では木村ら²⁶⁾とアメリカで Fananapazir ら²⁷⁾が報告している。いずれも変異を有した者は肥大型心筋症を発症している。以上のことから β-MHC 遺伝子のうちアミノ酸番号741番の Gly が別のアミノ酸に変異することが肥大型心筋症の原因として大きな要因であると考えられる。

表3 B家系における臨床所見, 心エコー所見, 発症年齢, 遺伝子検索

患者	年齢(歳) /性	臨床所見	心エコー所見				発症年齢 (歳)	遺伝子変異		
			PWT (mm)	IVST (mm)	SAM	ASH		β -MHC Gly741Trp	Tn-T Lys253Arg	mtDNA Tyr3394His
I-1	71/女	肥大型心筋症	9	14	+	+	51	+	-	-
II-1	53/男	健常者	NA	NA	NA	NA	-	-	+	-
II-2	52/女	肥大型心筋症	7	14	+	+	36	+	-	-
III-1	28/女	閉塞性肥大型心筋症	7	29	+	+	11	+	-	-
III-2	26/男	閉塞性肥大型心筋症, 心房中隔欠損症	7	22	+	+	9	+	+	-

PWT: posterior wall thickness 後壁厚, IVST: interventricular septal thickness 心室中隔厚, SAM: systolic anterior motion 収縮期前方運動, ASH: asymmetric septal hypertrophy 非対称性心室中隔肥大, NA: not analyzed 未測定, β -MHC: β -myosin heavy chain gene β ミオシン重鎖遺伝子, Tn-T: cardiac troponin T gene 心筋トロポニン T 遺伝子, mtDNA: mitochondrial DNA ミトコンドリア遺伝子.

A家系ではこの β -MHC 遺伝子変異のほかに, mtDNA の重複遺伝子異常も認められた. この mtDNA 変異は塩基番号 3394 でチロシンからヒスチジンのアミノ酸置換を伴った変異である. 今までの肥大型心筋症の遺伝子異常の報告で, β -MHC 遺伝子ならびに mtDNA 重複遺伝子異常は Arbustini ら²⁸⁾ (β -MHC Arg249Gln, mtDNA A4300G) の報告のみである. この塩基番号 3394 のチロシンからヒスチジンの変異は, 我々が経験した家族性 QTU 延長の患者²⁹⁾ や Leber 病 (LHON)³⁰⁾³¹⁾, 糖尿病患者³²⁾ で報告されている点変異の一つである. 塩基番号 3394 は複合体 I [NADH-コエンザイム Q (ユビキノン) 還元酵素 (NADH-CoQ)] の ND1 をコードする部分に位置し, 機能解析の結果, complex I 活性と酸素消費量で有意な減少が認められた部分でもあり²⁹⁾, 正常者では 1~2% 程度しかみられない稀な多型変異と報告されている部位である³¹⁾. この家系でも QTU 延長の家系と同様, 運動負荷後の回復期に QTU の延長を認めている. 体細胞の中で変異した mtDNA が, ある一定の値を越えて増加したとき, その細胞内のミトコンドリアは酵素欠損をきたし, 機能を失うと考えられている³²⁾.

A家系では肥大型心筋症の主たる疾患遺伝子としては β -MHC 遺伝子異常が考えられるが, mtDNA 異常の合併により, さらに病態の悪化を促進させている可能性が考えられる.

しかし, 同一遺伝子変異を持った同一家系内の

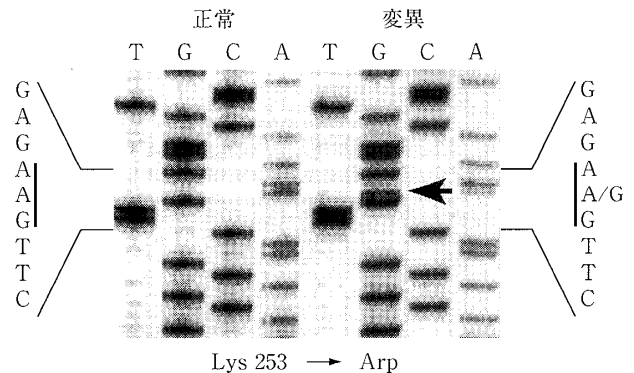


図5 B家系において健常である父親 (II-1) と患者である息子 (III-2) に心筋トロポニン T 遺伝子 Lys253 \rightarrow Arg (エクソン 14) に多型変異 (正常 1~2%) を認めた.

患者においても, 心エコーで PWT が 7~14mm, IVST で 12~30mm, また SAM や ASH の出現の有無にも違いがみられた. また発症年齢を比較しても 7~50 歳とやはり同様にばらつきが認められ, また肥大型心筋症, 閉塞型肥大型心筋症と表現型の違いもみられた.

さらに 1 つの疑問点として, 比較的同一な環境下で生活を共にする同一家系内の同一遺伝子変異を持った患者間に, 臨床所見や表現型に差がみられることである. これを説明する一助となる事例としては, A家系内で II-5 は先天性股関節亜脱臼により 20 歳まで運動制限を受けていたことにより肥大型心筋症の発症年齢が 50 歳と家系内では一番遅かった事柄が挙げられる. このことから運

表4 B家系Ⅲ-1, 2におけるミトコンドリアDNAの同一変異部位

	塩基番号	遺伝子変異	アミノ酸	遺伝子領域	
1	73	A → G		D-loop	
2	194	C → T		D-loop	
3	263	A → G		D-loop	
4	489	T → C		D-loop	
5	2706	A → G		16SrRNA	
6	3010	G → A		16SrRNA	
7	3423	G → T	GTG → GTT	Val	ND1
8	4769	A → G	ATA → ATG	Met	ND2
9	4985	G → A	CAG → CAA	Gln	ND2
10	5178	C → A	CTA → ATA	Leu → Met	ND2
11	7028	C → T	GCC → GCT	Ala	CO1
12	7403	A → G	CCA → CCG	Pro	CO1
13	8860	A → G	ACA → GCA	Thr → Ala	ATP6
14	8964	C → T	ACC → ACT	Thr	ATP6
15	9296	C → T	GGC → GGT	Gly	CO3
16	9397	A → G	GGA → GGG	Gly	CO3
17	9540	T → C	TTA → CTA	Leu	CO3
18	9559	G → C	CGA → CCA	Arg → Pro	CO3
19	9667	A → C	AAC → ACC	Asn → Thr	CO3
20	9824	T → A	CTT → CTA	Leu	CO3
21	10398	A → G	ACC → GCC	Thr → Ala	ND3
22	10400	C → T	ACC → ACT	Thr	ND3
23	11335	T → C	AAT → AAC	Asn	ND4
24	11447	C → G	CTA → GTA	Leu → Val	ND4
25	11719	G → A	GGG → GGA	Gln	ND4
26	14199	G → T	CCA → CAA	Pro → Gln	ND6
27	14272	G → C	TTC → TTG	Phe → Leu	ND6
28	14662	A → G	GCT → GCC	Ala	ND6
29	14668	C → T	ATG → ATA	Met	ND6
30	14783	T → C	TTA → CTA	Leu	Cyt b
31	15043	G → A	GGG → GGA	Gly	Cyt b
32	15301	G → A	TTG → TTA	Leu	Cyt b
33	15326	A → G	ACA → GCA	Thr → Ala	Cyt b
34	16093	T → C			D-loop
35	16362	T → C			D-loop

Ala: アラニン, Arg: アルギニン, Asn: アスパラギン, Gln: グルタミン, Gly: グリシン, Leu: ロイシン, Met: メチオニン, Phe: フェニルアラニン, Pro: プロリン, Thr: スレオニン, Val: バリン.

D-loop: コントロール領域, 16SrRNA: 16SのリボソームRNA, ND1~6: 複合体Iユビキノン酸化還元酵素サブユニット, Cyt b: 複合体Ⅲチトクロムc酸化還元酵素サブユニット, CO1~3: 複合体Ⅳチトクロムc酸化酵素サブユニット, ATP6: 複合体VATP合成酵素サブユニット.

動負荷と臨床所見の現れ方の間に何らかの関係があることが考えられる。

我々はこれらの疑問に答えるために拡張相肥大型心筋症モデルハムスター（ δ サルコグルカン遺伝子の欠失）において、幼若期（23週齢）と成獣期（41週齢）に有酸素運動を施行し、運動負荷を

加える時期の違いによる病態への影響を検討し、報告をした³³⁾。その結果、幼若期における有酸素運動は、その病態を改善する方向に影響し、悪化を防ぐ可能性を示したが、成獣での運動負荷は心臓に過剰な負荷を加え、心筋細胞や心筋組織障害をもたらす、運動負荷を加えなかった群より、か

		nt5178					nt8860					nt9559					nt9667																													
1	ヒト	Human	S	R	T	N	K	L	T	L	T	P	L	P	L	W	A	G	T	V	I	M	G	F	G	G	H	W	P	R	T	G	I	T	P	H	S	L	M	E	N	N	R	N	Q	M
2	チンパンジー	Pan troglodytes	S	R	T	N	K	L	T	L	T	P	L	P	L	*	A	G	T	V	I	I	G	F	G	G	H	W	P	P	T	G	I	T	P	H	S	L	I	E	N	N	R	N	Q	I
3	ゴリラ	gorilla	S	R	T	N	K	L	T	L	I	P	L	P	L	*	A	G	T	V	I	T	G	F	G	G	H	*	P	P	T	G	I	I	P	H	S	L	I	E	N	N	R	N	Q	I
4	オランウータン	Pongo pygmaeus	S	R	S	N	K	L	T	L	L	P	L	P	L	*	L	A	T	V	L	I	G	F	G	G	H	*	P	P	T	G	I	T	P	H	S	L	I	E	N	N	R	N	Q	I
5	テナガザル	Hylobates lar	S	R	T	N	K	L	T	L	T	P	L	P	L	*	A	G	T	V	I	T	G	F	G	G	H	W	P	P	S	G	I	H	P	H	S	L	M	E	N	N	R	T	Q	I
6	カバ	Hippopamus amphibiu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	L	*	A	G	T	V	T	G	F	G	G	C	*	P	P	T	G	I	N	P	H	S	L	I	E	N	N	R	N	Q	T		
7	イヌ	Canis familiaris	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	L	*	A	G	T	V	I	L	G	F	G	G	C	*	P	P	T	G	I	N	P	H	S	L	I	E	N	N	R	K	H	I	
8	クマネズミ	Rattus norvegicus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	L	*	A	G	T	V	A	T	G	F	G	G	C	W	P	P	T	G	I	I	T	H	S	L	I	E	N	N	R	K	Q	T	
9	ニワトリ	Gallus gallus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	H	*	P	P	T	G	I	T	P	H	S	L	I	E	N	A	R	K	Q	A	
10	トカゲ	Eumeces egregius	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	L	*	L	A	T	V	L	I	G	I	G	G	H	W	P	P	T	G	I	T	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11	スズキ (魚類)	Haichoerus grtpus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	L	*	A	A	T	V	I	L	G	F	G	G	C	*	P	P	T	G	I	T	P	H	S	L	I	E	N	S	R	K	Q	I	

		nt10398					nt11447					nt15326																							
1	ヒト	Human	K	G	L	D	W	T	E	L	V	Y	S	I	A	G	S	M	L	L	A	A	V	L	I	A	A	L	A	T	L	H	L	L	F
2	チンパンジー	Pan troglodytes	K	G	L	D	*	T	E	L	V	Y	S	I	A	G	S	I	V	L	A	G	V	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	ゴリラ	gorilla	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	A	G	S	M	L	L	A	A	V	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	オランウータン	Pongo pygmaeus	K	G	L	D	*	T	R	L	V	S	S	I	A	G	S	I	V	L	A	A	I	L	I	T	A	L	T	T	L	H	L	L	F
5	テナガザル	Hylobates lar	K	G	L	E	*	T	E	L	V	I	S	I	A	G	S	M	L	L	A	A	L	L	I	A	A	L	A	A	L	H	L	L	F
6	カバ	Hippopamus amphibiu	K	G	L	E	*	T	E	Y	D	N	*	I	A	G	S	I	L	L	A	A	L	L	I	A	A	L	A	M	V	H	L	L	F
7	イヌ	Canis familiaris	K	G	L	E	*	A	E	-	-	-	I	A	G	S	I	V	L	A	A	V	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	クマネズミ	Rattus norvegicus	K	G	L	D	*	A	E	L	V	N	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	ニワトリ	Gallus gallus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	A	G	S	I	L	L	A	A	L	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	トカゲ	Eumeces egregius	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	A	G	S	I	V	L	A	A	I	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11	スズキ (魚類)	Haichoerus grtpus	K	G	L	E	*	T	E	L	V	Y	S	I	A	G	S	I	V	L	A	A	I	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

図6 アミノ酸置換を伴うミスセンス変異9カ所のうち7カ所における異属種間のアミノ酸の比較
 ミスセンス変異9カ所のうち2カ所(14199,14272)はジーンバンクでの検索ができなかった。検索ができた7カ所のうち6カ所は比較的異属種間でも保存されているのが確認できた。

えて心不全の病態を招く可能性が確認されている。A家系とハムスターでは肥大型心筋症の疾患遺伝子が異なっているが、肥大型心筋症における運動負荷のあり方は、疾患の発症や病態に大きな影響を及ぼしている可能性が考えられる。以上より肥大型心筋症の表現型は、遺伝子異常のみに規定されているのではなく運動要因など他の物理的、環境的因子にも影響されていることが考えられた。

B家系では、息子(III-2,患者)は母親(II-2,患者)からβ-MHC遺伝子異常(Gly741Trp)を、さらに父親(II-1,健常者)からは稀な多型とされているTn-T遺伝子異常(Lys253Arg)をそれぞれ受け継いでいた。家系内で比較すると息子(III-2)は症状も重く、発症年齢も9歳と最も若く、肥大型心筋症の主たる疾患遺伝子としてはβ-MHCが考えられるが、稀なTn-T遺伝子異常の重複遺伝子異常が早期発症や病態の悪化を促進している可能性が考えられた。現在、Tn-Tで報告されている変異は13カ所ある²⁹⁾。今回我々が報告した変異(Lys253Arg)によって肥大型心筋症が発症した報告はなく、稀な多型変異とされるものであった。しかし一般にTn-T変異を有している患者の心室

肥大は比較的軽度であるが、中高年期に拡張相肥大型心筋症に移行する例がしばしば認められ、予後は不良とされている。従って、我々はこの稀なTn-Tの多型変異とβ-MHCや他の重複遺伝子変異を持っている患者の病態との関係を詳細に検討する必要があると考え、現在経過観察中である。

B家系におけるmtDNA変異検索では、結果で示すとおり、娘、息子(III-1,2)の共通の変異は35カ所であった(表4)。そのうちアミノ酸置換を伴うミスセンス変異は9カ所であり、残りの26カ所はアミノ酸置換のないサイレント変異であった。そのうちの塩基番号5178,8860,9667,10398,11447,15326は種を超えてアミノ酸がよく保管されている部位であった。特に塩基番号5178,8860,9667は検討した全ての種においてアミノ酸が完全に保存されており、特に機能的に重要な部位であることが示唆される。換言するとこの部位におけるミスセンス変異は、ミトコンドリアの機能低下を引き起こし、肥大型心筋症の病態悪化に大きな影響を与えている可能性が考えられる。

また塩基番号9559は、今回検討したヒト以外の種は全てプロリンであり、ヒト以外の種間で高率に保存されていた。ヒトだけでプロリンがアルギ

ニンに置換している事実はヒトのみに起こったこの変化が、種の進化上、意味を有するものである可能性が考えられた。III-1, 2の患者に生じたアルギニンからプロリンへの変異はこうした進化の逆行であり、この変異がミトコンドリア機能に影響を与えている可能性も考えられた。

このように種を超えてアミノ酸が保存されている部位におけるミスセンス変異は、ミトコンドリアの機能低下を引き起こすことを通して、肥大型心筋症の病態悪化に影響を与えている可能性が考えられる。

また、A, B家系共通で、世代が進むにつれて発症年齢が若くなってきており、さらに心筋壁の肥厚が進み、表現促進が認められた。ここで一つの推察としては、遺伝子変異が世代が進むにつれ蓄積されその症状の表現促進が促されるという可能性も一要因として考えられるが、ほかに外部要因(ウイルス病原体, 有害物質, ストレスほか)や生活習慣要因(運動負荷, 食生活, 生活環境ほか)などさまざまな要因が複雑に重なり合っこのような表現促進が見られたものと考えた。

まとめ

肥大型心筋症を引き起こす主たる疾患遺伝子としては β -MHC異常(Gly741Trp)が考えられるが、さらにmtDNA塩基番号3394の変異や、多型変異部位であっても種を超えて保存されている部位における異常により、その病態の悪化を促進させている可能性が考えられる。肥大型心筋症の症状の悪化と予後は、重複遺伝子異常の存在だけで規定されているのではなく、運動負荷など、他の物理的環境因子が修飾している可能性が考えられた。

稿を終えるにあたり、本研究にご協力いただきました東京女子医科大学附属日本心臓血管研究所今村伸一郎博士に深謝するとともに、貴重なご助言とご指導をいただきました東京女子医科大学高尾篤良名誉教授、門間和夫名誉教授に深謝致します。

この研究の一部は平成11~12年度文部省科学研究助成一般研究Cの助成を受けたことを付記する。

文 献

- 1) **Maron BJ, Casey SA, Poliac LC et al:** Clinical course of hypertrophic cardiomyopathy in a regional United States cohort. *JAMA* **281**: 650-655, 1999
- 2) **Mckenna W, Deanfield J, Faruqui A et al:** Prognosis in hypertrophic cardiomyopathy: Role of age and clinical, electrocardiographic and hemodynamic features. *Am J Cardiol* **47**: 532-538, 1981
- 3) **Hopf R, Kaltenbach M:** 10-year results and survival of patients with hypertrophic cardiomyopathy treated with calcium antagonists. *In* *New Aspects of Hypertrophic Cardiomyopathy: Morphology, Mechanism and Therapy* (Kaltenbach M et al eds) pp230-242, Steinkopff Verlag, Darmstadt (1988)
- 4) **Maron BJ, Roberts WC, Epstein SE:** Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: A profile of 78 patients. *Circulation* **65**: 1388-1394, 1982
- 5) **Maron BJ, Lipson LC, Roberts WC et al:** "Malignant" hypertrophic cardiomyopathy: identification of a subgroup of families with unusually frequent premature death. *Am J Cardiol* **41**: 1133-1140, 1978
- 6) **Mckenna WJ, Borggreffe M, England D et al:** The natural history of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: An electrocardiographic study. *Circulation* **66**: 1233-1240, 1982
- 7) **Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G et al:** A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: A β cardiac myosin heavy chain gene missense mutations. *Cell* **62**: 999-1006, 1990
- 8) **Thierfelder L, Watkins H, MacRae C et al:** α -Tropomyosin and cardiac Troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: A disease of the sarcomere. *Cell* **77**: 701-712, 1994
- 9) **Watkins H, Conner D, Thierfelder L et al:** Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* **11**: 434-437, 1995
- 10) **Bonne G, Carrier L, Bercovici J et al:** Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* **11**: 438-440, 1995
- 11) **Poetter K, Jiang H, Hassanzadeh S et al:** Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nat Genet* **13**: 63-69, 1996

- 12) **Kimura A, Harada H, Park JE et al:** Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* **16**: 379-382, 1997
- 13) **Satoh M, Takahashi M, Sakamoto T et al:** Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem Biophys Res Commun* **262**: 411-417, 1999
- 14) **Mogensen J, Klausen IC, Pedersen AK et al:** α -cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* **103**: R39-R43, 1999
- 15) **Wang F, Harvey EV, Conti MA et al:** A conserved negatively charged amino acid modulates function in human nonmuscle myosin IIA. *Biochemistry* **39**: 5555-5560, 2000
- 16) **Ozawa T, Tanaka M, Sugiyama S et al:** Multiple mitochondrial DNA deletions exist in cardiomyocytes of patients with hypertrophic or dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* **170**: 830-836, 1990
- 17) **Hattori K, Ogawa T, Kondo T et al:** Cardiomyopathy with mitochondrial DNA mutations. *Am Heart J* **122**: 866-869, 1991
- 18) **Obayashi T, Hattori K, Sugiyama S et al:** Point mutations in mitochondrial DNA in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* **124**: 1263-1269, 1992
- 19) **Goto Y, Nonaka I, Horai S:** A mutation in the tRNA^{Leu(UUR)} gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* **348**: 651-653, 1990
- 20) **Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K et al:** A point mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene in MELAS (Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). *Biochem Biophys Res Commun* **173**: 816-822, 1990
- 21) **van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W et al:** Mutation in mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet* **1**: 368-371, 1992
- 22) **Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya EV et al:** Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4kb mitochondrial DNA deletion. *Net Genet* **1**: 11-15, 1992
- 23) **Arai S, Matsuoka R, Hirayama K et al:** Missense mutation of the β -cardiac myosin heavy-chain gene in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Med Genet* **58**: 267-276, 1995
- 24) **Anderson S, Bankier AT, Barrell BG et al:** Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457-465, 1981
- 25) **Dibb NJ, Maruyama IN, Krause M et al:** Sequence analysis of the complete caenorhabditis elegans myosin heavy chain gene family. *J Mol Biol* **205**: 603-613, 1989
- 26) **Kimura A, Nishi H, Harada H et al:** Genetic analysis of hypertrophic cardiomyopathy in Japan. *In* Developmental Mechanisms of Heart Disease (Clark EB, Markwald RR, Takao A eds) pp 113-120, Futura, New York (1994)
- 27) **Fananapazir LD, Dalakas MC, Cyran F et al:** Four missense mutations in the β -myosin heavy-chain gene cause central core disease in hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3993-3997, 1993
- 28) **Arbustini E, Fasani R, Morbini P et al:** Coexistence of mitochondrial DNA and β myosin heavy chain mutations in hypertrophic cardiomyopathy with late congestive heart failure. *Heart* **80**: 548-558, 1998
- 29) **Matsuoka R, Furutani M, Hayashi J et al:** A mitochondrial DNA mutation cosegregates with the pathophysiological U wave. *Biochem Biophys Res Commun* **257**: 228-233, 1999
- 30) **Johns DR, Neufeld MJ, Park RD:** An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* **187**: 1551-1557, 1992
- 31) **Brown MD, Torroni A, Reckord CL et al:** Phylogenetic analysis of Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA's indicates multiple independent occurrences of the common mutations. *Hum Mutat* **6**: 311-325, 1995
- 32) **Hirai M, Suzuki S, Onoda M et al:** Mitochondrial DNA 3394 mutation in the NADH dehydrogenase subunit 1 associated with Non-Insulin-Dependent diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* **219**: 951-955, 1996
- 33) **龍口万里子, 松岡瑠美子, 平塚江里子ほか:** 拡張相肥大型心筋症モデル動物における運動負荷による心筋細胞への影響. *東女医大誌* **70**: 264-275, 2000