Compound heterozygosity deteriorates phenotypes of hypertrophic cardiomyopathy with founder MYBPC3 mutation: evidence from patients and zebrafish models

メタデータ	言語: en 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属: 金沢大学
URL	http://hdl.handle.net/2297/43543

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.

タイトル：Compound heterozygosity deteriorates phenotypes of hypertrophic cardiomyopathy with founder MYBPC3 mutation: evidence from patients and zebrafish models.
雑誌：American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 307: H1594-H1604, 2014.
著者：宝達明彦、今野哲雄、林研至、舟田晃、藤田崇志、永田庸二、藤野陽、川尻剛照、山岸正和

本論文は2015年12月に出版社のウェブサイトにてフリーアクセスで公開される予定であり、全文はそちらを参照されたい。

背景：

肥大型心筋症は、サルコメア遺伝子変異を原因とする遺伝性心疾患であり、心筋の肥大・線維化を特徴とする。現在までに、サルコメア遺伝子のうちミオシン結合蛋白C遺伝子(MYBPC3)変異例では軽症の表現型をきたし、心筋βミオシン重鎖の変異例では予後不良であるといった遺伝型-表現型の関連について報告がなされてきた。近年、サルコメア遺伝子変異を複数有する例において、より若年での発症や著名な心肥大、収縮不全への進行など重症の臨床表現型を呈する可能性が報告されている。そこで今回我々は、肥大型心筋症患者の遺伝子解析を行い、33例のMYBPC3創始者変異の保因者を見出した。うち5例は複数の遺伝子変異を有しており、単一変異例と比較検討することにより、複数変異例の臨床表現型への影響を検討した。またゼブラフィッシュを用いてヒトで見いだされた遺伝子変異を再現し、心臓表現型を観察することにより、遺伝子型-表現型の関連を検討した。

方法：

本研究は金沢大学医学倫理審査員会により承認され、対象者またはその保護者全例に同意を得て行われた。金沢大学およびその関連病院で肥大型心筋症と診断された発端者 488 例に対して一本鎖高次構造多型(Single Strand Conformation Polymorphism)法または高分解能融解曲線を用いてサルコメア遺伝子変異の検索を行った。見いだされた変異は制限酵素断片長多型(Restriction Fragment Length Polymorphism)法により確認され、また正常対象例200例においても同手法により確認した。臨床表現型は通常の12誘導心電図、心エコー、ガドリニウム遅延造影法を用いた心臓MRIで評価した。

ゼブラフィッシュを用いた実験も金沢大学動物実験規定に基づき行われた。次にゼブラフィッシュ胚にMYBPC3に対するアンチセンスモルフォリノオリゴをマイクロインジェクションし、内因性MYBPC3のノックダウンを行った。同時に野生型および変異型MYBPC3 mRNAをマイクロインジェクションすることにより、ヒトの遺伝子変異を再現し心臓表現型を解析した。野生型モデルは野生型 mRNA 200pg のみ、単一変異モデルは野生型 mRNA および Ala745Asp(ヒト Val762Asp 変異に相当) mRNA を 100pg ずつ、複合ヘテロ接合体モデルは Ala745Asp および Arg815Gln(ヒト Arg820Gln 変異に相当) mRNA を100pg ずつ、マイクロインジェクションを行った。心機能の解析には心臓にGFPが発現しているhspGFF3A系統を用い、受精後72時間の時点で実体蛍光顕微鏡により動画を記録し心室径、心室内径短縮率、心房面積、心拍数の評価を行った。

統計にはIBM社のSPSS statistics software version 22) for windowsを使用した。連続変数にはunpaired t testを、 カテゴリデータにはカイ2乗またはFisherの正確確率検定を、ゼブラフィッシュ実験の群間比較にはボンフェローニ補正を用いた分散分析を、カプランマイヤー曲線はノンパラメトリックログランクテストを用いて検討した。

結果：

MYBPC3 Val762Asp 変異を19例に検出し、家系調査を行い計33例の保因者を見出した。同変異はMYBPC3周囲のマイクロサテライトマーカーの解析から創始者変異と判断した。33例の保因者のうち5例は複数の遺伝子変異を有し、2例はIVS21+1 G>A変異、1例はArg820Gln変異との複合ヘテロ接合体であり、残りの2例は心筋トロポニンT遺伝子Phe110Ile変異を有する重複変異例であった。MYBPC3 Val762Asp 単独変異例は他のMYBPC3変異例に比し、年齢、性別、心室最大壁厚、左室駆出率、収縮不全への進行例で有意さを認めなかったが、Kaplan Meier法を用いた解析では有意に高齢で診断された(P = 0.046)。一方、MYBPC3 複合ヘテロ接合性変異例は若年発症、心筋の広範囲の線維化、拡張相への移行など重症の表現型を呈した。

ゼブラフィッシュを用いた検討では、モルフォリノオリゴ単独群に比し、野生型モデル、単一変異モデル、複合ヘテロ接合体モデルでは有意に生存率が改善した。また、モルフォリノオリゴ単独群に比し、野生型モデルおよび単一変異モデルは心室径、心室内径短縮率、心房面積、心拍数に有意な変化を認めなかったが、複合ヘテロ接合体モデルでは有意に心室の拡大、心拍数の増加を認めた(心室径; 96.3±2.0 対 86.5±2.6, p = 0.046, 心拍数; 163±4 vs. 147±4, p = 0.023)。

今回見出したMYBPC3 Val762Asp創始者変異は高齢発症で軽症の肥大型心筋症表現型を示すが、他のサルコメア遺伝子変異と重複することで重症の臨床表現型を呈する可能性がある。