

肥大型心筋症における心筋 β -ミオシン重鎖遺伝子変異と臨床像に関する分子遺伝学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4563

肥大型心筋症における心筋 β -ミオシン重鎖遺伝子変異と 臨床像に関する分子遺伝学的研究

金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管分子遺伝学
(旧講座名：内科学第二)
(主任：馬淵 宏教授)

江 本 従 道

肥大型心筋症 (hypertrophic cardiomyopathy, HCM) は、形態学的には心室の拡張を伴わない心室壁の不均一な肥厚、血行動態的には心室の拡張障害、病理組織学的には心筋細胞の肥大と錯綜配列、心筋間質線維化を特徴とする疾患である。以前より、HCM患者の半数以上に家族性が認められ、常染色体優性遺伝形式を示すことが知られていた。近年の分子遺伝学的研究の進歩により、HCMは心筋 β -ミオシン重鎖 (β -myosin heavy chain, β MHC)、心筋トロポニンTおよび心筋ミオシン結合蛋白-Cなどの心筋サルコメアを構成する蛋白質の遺伝子変異が原因であることが明らかになり、これまでに少なくとも9種類の原因遺伝子が報告されている。このうち、心筋 β MHC遺伝子異常はHCMの原因遺伝子異常の約20%から30%を占め、最も頻度が高いと報告されている。しかしながら、HCMの原因遺伝子異常の頻度や遺伝子型と臨床像、予後との関係など未だ十分に解明されたとは言えない。本研究では、北陸地方在住の異なる168家系のHCM発端者について、心筋 β MHC遺伝子異常の頻度、種類、遺伝子変異と表現型の関係について検討した。患者末梢血白血球より高分子DNAを抽出し、心筋 β MHC遺伝子のエクソン3からエクソン24までの領域についてPCRによりDNA断片を増幅した。その後、PCR一本鎖コンフォメーション多型 (PCR-single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP) 法および直接塩基配列決定法により遺伝子変異を同定した。さらに、PCR制限酵素切断多型 (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 法を用いて遺伝子変異の確認を行った。今回HCM発端者168名における検討で、Ala26Val, Ala200Thr, Gly733Glu, Met822Leu, Arg858Cys, Arg870Cys, Glu935Lysの7種類の心筋 β ミオシン重鎖遺伝子変異を見出した。このうち、Ala200Thr, Gly733Glu, Met822Leu, Arg858Cysの4種類は、これまでに報告がなく新変異であった。北陸地方の肥大型心筋症における心筋 β ミオシン重鎖遺伝子変異の頻度は6.0%であった。これらの遺伝子変異のうち、Gly733Glu, Arg858Cys, Arg870Cys, Glu935Lysは荷電変化を伴っていた。また、遺伝子上の機能部位では、Ala200ThrがATP結合部位近傍に、Gly733Gluがアクチン結合部位近傍に、Met822Leu, Arg858Cys, Arg870Cysがミオシン軽鎖結合部位近傍に各々位置していた。臨床像についての検討では、拡張相肥大型心筋症例が、Gly733Gluを有する家系に1名、Met822Leuを有する家系に2名認められた。また、突然死がMet822Leu, Arg858Cys, Arg870Cysの各遺伝子変異を有する家系に認められた。これらの結果より、 β MHC遺伝子変異における臨床病型には、荷電変化の有無よりも遺伝子変異の存在する機能部位が深く関わっている可能性が示唆された。

Key words hypertrophic cardiomyopathy, cardiac β -myosin heavy chain gene, gene mutation, sarcomere, sudden death

肥大型心筋症 (hypertrophic cardiomyopathy, HCM) は、高血圧症や心臓弁膜症等の明らかな原因疾患がないにもかかわらず心室壁の肥厚をきたし、その経過中に突然死や心臓機能障害が認められる疾患である¹⁾。病理組織学的には、心筋細胞の肥大と錯綜配列および結合組織の増生を特徴とする²⁾。本疾患の原因は長い間不明であったが、その50%以上に常染色体優性遺伝形式をとる家族内発症が認められることが知られていた³⁾。近年の分子遺伝学的研究の進歩と相まってHCMにおいても原因遺伝子の探究が精力的に行われ、1989年Jarchoら⁴⁾はフランス系カナダ人のHCM大家系の連鎖解析から、HCMの原因遺伝

子の1つが第14番染色体上に存在することを初めて報告した。同時期に心筋 β -ミオシン重鎖 (β -myosin heavy chain, β MHC) 遺伝子が第14番染色体長腕 (14q11.2-q13) 上に存在することが報告された⁵⁾ことから、Geisterfer-Lowranceら⁶⁾は心筋 β MHC遺伝子に対して解析を行い、1990年家族性HCMの患者に初めて点変異を見出し報告した。その後、HCMの原因遺伝子検索が多くの施設でなされ、これまでに40種類以上の心筋 β MHC遺伝子変異が報告されている^{7)~33)}。

一方、連鎖解析により心筋 β MHC以外の原因遺伝子の存在が指摘され、HCMの遺伝学的不均一性が明らかになった。連

平成13年3月14日受付, 平成13年5月14日受理

Abbreviations: ASH, asymmetric septal hypertrophy; FS, fractional shortening; HCM, hypertrophic cardiomyopathy; HOCM, hypertrophic obstructive cardiomyopathy; MBPC, myosin binding protein C; β MHC, β -

鎖解析とそれにひき続く候補遺伝子アプローチにより、新たな HCM の原因遺伝子として、第1番染色体長腕 (1q32) 上の心筋トロポニン T (troponin T, TnT) 遺伝子³⁴⁾³⁵⁾、第15番染色体長腕 (15q22) 上の心筋 α トロポミオシン (α -tropomyosin, α TM) 遺伝子^{34)~36)}、第11番染色体短腕 (11p11.2) 上の心筋ミオシン結合蛋白 C (myosin binding protein C, MBPC) 遺伝子^{37)~39)}、第3番染色体短腕 (3p21.2-p21.3) 上の心室型ミオシンアルカリ軽鎖 (ventricular myosin essential light chain, vMLC1) 遺伝子⁴⁰⁾、第12番染色体長腕 (12q23-q24.3) 上の心室型ミオシン調節軽鎖 (ventricular myosin regulatory light chain, vMLC2) 遺伝子⁴⁰⁾、第19番染色体 (19p13.2-q13.2) 上の心筋トロポニン I (troponin I, TnI) 遺伝子⁴¹⁾、第15番染色体長腕 (15q11) 上の心筋 α アクチン (cardiac α -actin, CACT) 遺伝子⁴²⁾、第2番染色体長腕 (2q31) 上のタイチン (titin) 遺伝子⁴³⁾が次々に同定され報告されている。心筋 β MHC 遺伝子を含むこれら9種類の遺伝子は、いずれも心筋の収縮に關与するサルコメアを構成する蛋白質の遺伝子であることから、HCM をサルコメア病であるとする概念が提唱されるに至った。しかしながら、その一方で HCM 症例の約半数は未だに原因遺伝子が不明のままである。

HCM の臨床像に關する報告もこれまでに数多くなされてい
る。形態学的特徴としての心室壁肥厚は左右心室の全ての部位
に生じ得るが、典型的な症例では心室中隔の肥厚が著明となり、
左室後壁との比が1.3以上のものは特に非対称性中隔肥厚
(asymmetric septal hypertrophy, ASH) と呼ばれている²⁾⁴⁴⁾。他
方、全周性の左室壁肥厚を示すものや心尖部に強い肥厚を示す
ものも認められる。特に心尖部に肥厚が強く心電図上巨大陰性
T波を呈するものは心尖部肥大型心筋症と呼ばれ、日本人に多
く欧米人には稀であると報告されている⁴⁵⁾⁴⁶⁾。血行動態的には、
心室の拡張機能障害 (コンプライアンスの低下) が特徴的であ
り⁴⁷⁾、左室流出路あるいは心室中部に閉塞を認める閉塞性肥
大型心筋症 (hypertrophic obstructive cardiomyopathy, HOCM)
と、閉塞を認めない非閉塞性肥大型心筋症 (hypertrophic non-
obstructive cardiomyopathy) に分類される⁴⁸⁾。また、心筋収縮
能は正常であるかむしろ亢進しているのが一般的であるが⁴⁹⁾、
HCM の4~12% は経過中に左室壁の非薄化、左室腔の拡大を
きたして左室収縮不全が進展し、拡張型心筋症と同様の病態を
呈する症例が認められ、拡張相肥大型心筋症と呼ばれてい
る^{50)~55)}。このように HCM の臨床像は極めて多様であり、不均
一性を示す。

近年、これら遺伝学的不均一性と臨床的不均一性の關係につ
いて注目されるようになった。心筋 β MHC 遺伝子と心筋 TnT
遺伝子といった原因遺伝子の種類の違いのみならず、同一遺
伝子でも変異の位置や遺伝子型の違いによる臨床像の差異が明
らかにされつつある。また、北米や西ヨーロッパでは心筋 β
MHC 遺伝子異常が HCM の20%~30% を占め最も多いと報告
されているが³⁵⁾、フィンランドでは少ないといった地域差も認
められている⁵⁶⁾。このことから、臨床的不均一性が遺伝学的不
均一性に由来するものではないかとの仮説が立てられるが、未
だ十分に解明されてはいない。

そこで、今回著者は北陸地方の HCM における心筋 β MHC
遺伝子異常の頻度を明らかにし、その変異の違いと臨床像との

關連性を明らかにする目的で本研究を行った。

対象および方法

I. 対 象

対象は、12誘導心電図所見および心臓超音波所見において
WHO/ISFC⁵⁷⁾の定義や Maron ら³⁾の診断基準、すなわち左室肥
大所見を認めること、左室肥大をきたす他の心疾患および全身
性疾患を有さないことを満たし、臨床的に HCM と診断された
北陸地方在住の発端者168名である。遺伝子解析については、
全員からインフォームド・コンセントを得て行った。

II. 方 法

1. 高分子DNAの抽出

対象者の末梢静脈血10mlを EDTA-2Na を抗凝固剤として採
取した後、4℃にて移送し、-20℃にて保存した。これを室温
にて解凍し、以下のごとく Triton X-100 融解変法⁵⁸⁾にて高分子
DNA を単離した。融解液 (320mM ショ糖液, 1% Triton X-100,
5mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl, pH7.6) にて赤血球を溶解させ、
遠心により沈殿として白血球を収集した。これをプロテアーゼ
(Sigma, St.Louis, USA) にて消化後、フェノール-クロロホルム
(1:1) で一回、続いてクロロホルム-イソアミルアルコール (24
:1) にて2回抽出し、最後にエタノール沈殿により DNA を分離
した。以上の様にして得られた DNA を Tris-EDTA 緩衝液
(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA-2Na, pH 8.0) に溶解の上、260nm
における吸光度を測定することにより濃度を求めた。

2. PCR

ジーンバンクのデータベースに登録されているヒト心筋 β
MHC 遺伝子配列をもとに、エクソン3からエクソン24までの
22エクソンについて設計した20塩基長前後のプライマー23組
を作成した。PCR産物がPCR-SSCP法による検出に適切な塩基
長となるように、エクソン16とエクソン22はそれぞれ2つに
分割し、便宜上エクソン16a, 16b, 22a, 22bと命名した。また、
エクソン7とエクソン8は、一組のプライマーでエクソン7+8
としてPCRを行った (表1)。プライマーの設計に際しては、5'
側と3'側の Tm 値ができる限り一致する様に考慮した。Tm 値
の解析には MacMeltTM ソフトウェア (Bio-Rad Laboratories,
Richmond, USA) を使用した。スプライス部位の変異検出のた
め、各プライマーはエクソンに隣接するイントロンを少なくとも
5bp以上含むものとした。

プライマーはペータシアノエチルホスホアミダイト法⁵⁹⁾にて
合成した。合成には DNA 合成機モデル ABI381A (Applied
Biosystems, Inc., Foster, USA) を用いた。アンモニア水に溶解
し、55℃で一晩静置したうえで-20℃に冷却し、真空下で遠
心して乾燥、再滅菌蒸留水1mlに溶解し、カラム NAP-5
(Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden) に通して精製した。これを
200倍に希釈し、260nmでの吸光度より濃度を測定して10pM
になるよう濃度を調整した。

DNA断片の増幅には、Saiki ら⁶⁰⁾による PCR法を用いた。高
分子DNA 1 μ g を鋳型 DNA として40pMのプライマー1セット
と200 μ Mの各デオキシヌクレオチド (dATP, dCTP, dGTP,
dTTP) と2.5単位の Taq ポリメラーゼ (東洋紡, 東京) を0.01%
ゼラチンを含む緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH8.3, 50mM KCl,

1.5mM MgCl₂) に加え、再滅菌蒸留水を加えて計 50 μ l とした。攪拌した後、遠心して反応液を集め、ミネラルオイル (Sigma) を適量滴下して蒸発を防ぎ、94°C 1分、T_m 値に基づきそれぞれのプライマーセットごとに決定した温度で1分、74°C 1分を1サイクルとしてくり返し、30サイクルの反応を行った。

増幅したDNA断片は、1%通常アガロースゲルにて泳動した。鎖長マーカーとして SUPERLADDER-LOW dsDNA Marker Kit

(Gen Sura Laboratories, San Diego, USA) を同時に泳動して断片長を確認した。

3. PCR一本鎖コンフォメーション多型 (PCR-single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP) 法

あらかじめ Tris-HCl 54g, ホウ酸 27.5g, 0.5M EDTA 20ml に蒸留水を加えて 3L にしたものを保存用の 5×Tris-ホウ酸-EDTA (Tris-boric acid-EDTA, TBE) 泳動緩衝液として準備し、泳動

Table 1. Oligonucleotides flanking exons of the cardiac β -myosin heavy chain gene for PCR amplification

Exon	Oligonucleotide name	Sequence
3	BEX3-5	5'-TTT AAG CTT CTG CTC CAC TCC AG-3'
	BEX3-3	5'-TTT TCT AGA CTC TCA CAT CAG CCT GA-3'
4	BEX4-5	5'-CAC TAT TGC CCT GTC ACT CA-3'
	BEX4-3	5'-ACC CTG CCT AGA CAC AAA CA-3'
5	BEX5-5	5'-CTA ACT CCC AAA ATC ACC AGC C-3'
	BEX5-3	5'-TTC TCC CTT CCT TCT CCC TCT C-3'
6	BEX6-5	5'-GAG GGA GAA GGA AGG GAG AA-3'
	BEX6-3	5'-GGG GAA AGA GGC TGA GTC TA-3'
7+8	BEX7+8-5	5'-GGC TTG TCG GTC TCC AGT AG-3'
	BEX7+8-3	5'-TCT GAG ACC ATT CCT CCA CC-3'
9	BEX9-5	5'-TTT AAG CTT CCC CCA ACT CAT CAC CA-3'
	BEX9-3	5'-TTT TCT AGA GCA AGG GTG AGC TTA-3'
10	BEX10-5	5'-TTC TCT CCT TCT TCT CCC CA-3'
	BEX10-3	5'-ATA GTT GGT CTC AGT CGG TG-3'
11	BEX11-5	5'-TCT TCC TCA GGC ATG TGC TG-3'
	BEX11-3	5'-TCT GCT TTT GGA CCC CTG TT-3'
12	BEX12-5	5'-CAA GGG ATC TCA CTT ACC CA-3'
	BEX12-3	5'-AAG AGA GAT GAC TGC TGA GC-3'
13	BEX13-5	5'-GGG AAG CTT ACC AAC TTT GCT CTT GCC-3'
	BEX13-3	5'-CCT ACC CTG CCC ACC CAT-3'
14	BEX14-5	5'-CCT GCT CAA TAT GGG CTC TC-3'
	BEX14-3	5'-GGG TCT AGA GGA GCG AGT GAG TGATG TT-3'
15	BEX15-5	5'-TTT AAG CTT TCT GAC TGC TCC CAC C-3'
	BEX15-3	5'-TTT TCT AGA TGG AAT TCA GGT GGT AAG G-3'
16	BEX16a-5	5'-TGA AGG ACA CTC AGT GAT GCT-3'
	BEX16a-3	5'-CCA GCC AAT GAT GTT GTA GTC-3'
	BEX16b-5	5'-GAA GCC TGA AGC CCA CTT CT-3'
	BEX16b-3	5'-TGT ACC GGG AGC CTC AGT C-3'
17	BEX17-5	5'-GGA TGG AAC TGG GTG AAG AA-3'
	BEX17-3	5'-AAG TGA AGA GGC CAG GAG AT-3'
18	BEX18-5	5'-CCC CTT CAT CTC TGT GAC CT-3'
	BEX18-3	5'-GTG GTT TGG AAA CCA CTG TG-3'
19	BEX19-5	5'-CTC ACA GAC TCC TCC TAC TTC CTT C-3'
	BEX19-3	5'-GCC TGG CTC CCC CTG TTC TAT GAG C-3'
20	BEX20-5	5'-GGA TCT GCA GGT GAC CCT GAA T-3'
	BEX20-3	5'-ACA ACA GGA AAA GCA TCA GAG G-3'
21	BEX21-5	5'-CCC TTC CTA AGG TAA TCC CA-3'
	BEX21-3	5'-GCA GTG TGT TCA TAT GAG CC-3'
22	BEX22a-5	5'-AGG CTC AGC ACT CCT TTC AA-3'
	BEX22a-3	5'-GGA CAC CAT CTT CTC CTC CA-3'
	BEX22b-5	5'-CTG CTG AAG AGT GCA GAA AG-3'
	BEX22b-3	5'-AGG GTG GAA GAG CCA ACA GT-3'
23	BEX23-5	5'-TTT AAG CTT GAA CAG CCT CCC CTC TGT-3'
	BEX23-3	5'-TTT TCT AGA CCC GGG CTG GAG CC-3'
24	BEX24-5	5'-ACC ATA CTG ACC TTG ACC CA-3'
	BEX24-3	5'-ACA AAT ATC CCC CCA TCC CA-3'

Oligonucleotides complementary to DNA sequences flanking exons of the human cardiac β -myosin heavy chain gene were synthesized on ABI 380A DNA synthesizer and used to amplify the intervening sequences with PCR.

直前に1×の濃度に希釈した。

0.5mM EDTA 2 μ l, 5N NaOH 10 μ l, 再滅菌蒸留水 88 μ lを混合してアルカリ溶液を作り, PCR産物 8 μ lにアルカリ溶液 2 μ lを加えて42℃で3分, 95℃で2分加熱後, 0℃に急冷して一本鎖に変性させた。次に, 10-20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲル(アトー, 東京)を用いて, TBE緩衝液中で4℃のもと80Vで12時間泳動した。染色にはBIO-RAD銀染色キット(Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA)を用い, プロトコルに従って銀染色を行った。すなわち, 10%エタノール, 5%酢酸混合液200mlにて15分間ゲルの固定を行い, 酸化剤100mlにて5分間酸化させた。蒸留水で5分間に1回水を換えながら15分間すすぎ, 余分な酸化剤を除いた後, 銀染色溶液を加え20分間振盪させた。その後蒸留水で1分間洗浄し, 現像液を加えてバ

ンドの出現を確認した。ある程度以上バンドが濃くなった時点で蒸留水で1分間すすいだ後, 5%酢酸100mlにて反応を停止させた。30%エタノール, 5%酢酸混合液200mlを保存液とし, 30分以上保存液内にゲルを浸した後, ゲルをセルロースフィルム2枚ではさみ, 密封して保存した。

4. 自動化直接塩基配列決定法

PCRで増幅したDNA断片を1%通常アガロースゲルに鎖長マーカーと共に泳動し, 断片長を確認した上で目的とするDNA断片のバンドを含む部分を切り出し, -80℃で2時間以上凍結した。次に, これを80℃で2分間加熱して解凍し, マイクロピュアとマイクロコン-50(Amicon)を組み合わせてこのDNA断片を濃縮すると同時に余分なプライマーおよびヌクレオチドを除去し, それを直接塩基配列決定法の鋳型DNAとし

Table 2. Oligonucleotide primers modified for PCR-RFLP analysis

Exon	Oligonucleotide name	Sequence
3	BEX3-3AV	5'-GAG GTC AAA AGG CCT GGT GTG-3'
7+8	BEX7+8-5AT	5'-CAG TAC TTT GCT GTT ATT GTA-3'
20	BEX20-3GE	5'-TCC TGC TAT CAA TGA ACT CT-3'
22	BEX22b-5RC	5'-CTA GAG AAG TCC GAG GCT AG-3'
23	BEX23-3GA	5'-GTT GCG CTT CTT GGC AGT AA-3'

Oligonucleotides complementary to DNA sequences flanking exons of the human cardiac β -myosin heavy chain gene were synthesized on ABI 380A DNA synthesizer and used to amplify the intervening sequences with PCR.

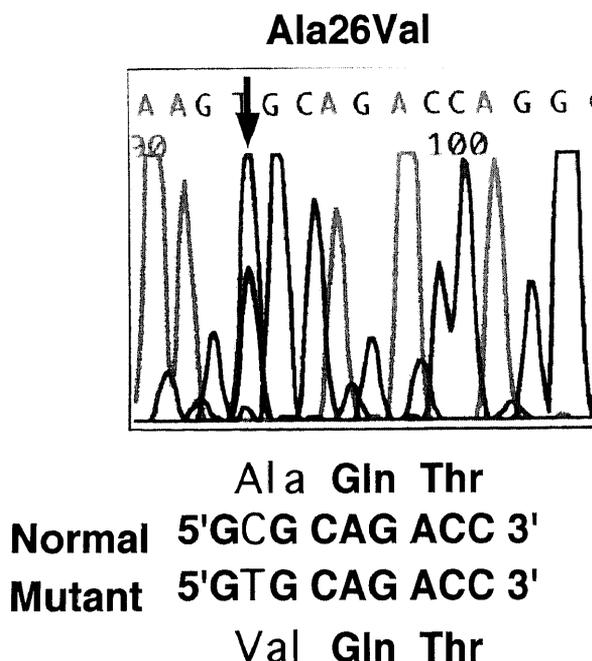


Fig. 1. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 3 of the human cardiac β MHC gene. The arrow indicates T peak of the mutant and C peak of the wild type.

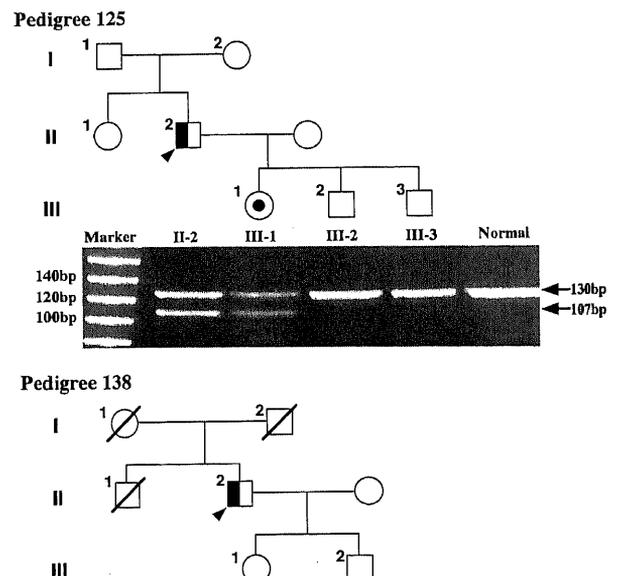


Fig. 2. The pedigree of family 125 and 138 and the result of PCR-RFLP analysis of family 125. The arrows in the pedigree indicate the probands. The square and the circle indicate male and female, respectively. I, II, III indicate generations. \square , diseased; \blacksquare , the Ala26Val mutation (heterozygote) present, clinically affected; \square , mutation present, but clinically unaffected; Digestion of the PCR products with Alw44I generates polymorphic restriction fragments of 130bp and/or 107bp. The proband and his daughter (III-1) show both 130bp and 107bp fragments, which indicate the heterozygotes for Ala26Val mutation.

た。これに、ダイ・ターミネーター・サイクルシークエンシング・キット (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, USA) を用いて、ダイ・ターミネーター法にて反応を行った。自動化直接塩基配列決定法として、ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, USA) を用いた。これはキ

ャピラリー型の塩基配列解析装置で、読みとられたデータはパーソナルコンピューター Power Macintosh G3 (Apple, Cuperutino, USA) 本体内蔵の固定ディスクに数値データとして保存された。反応終了後に塩基配列解析を自動的にを行い、配列を文字データおよび波形のグラフとして出力した。

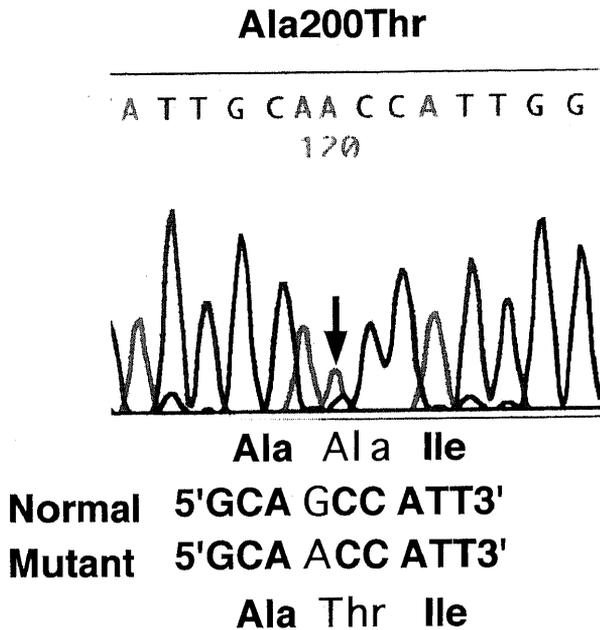


Fig. 3. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 7 of the human cardiac β MHC gene. The arrow indicates A peak of the mutant and G peak of the wild type.

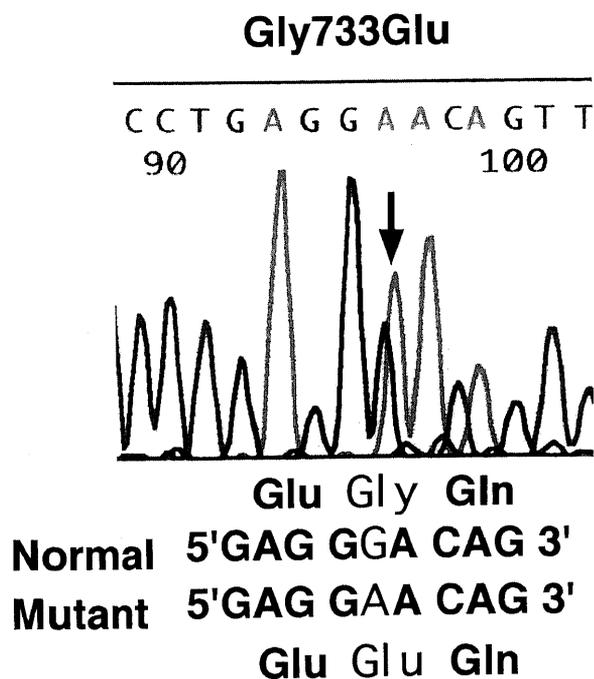


Fig. 4. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 20 of the human cardiac β MHC gene. The arrow indicates A peak of the mutant and G peak of the wild type.

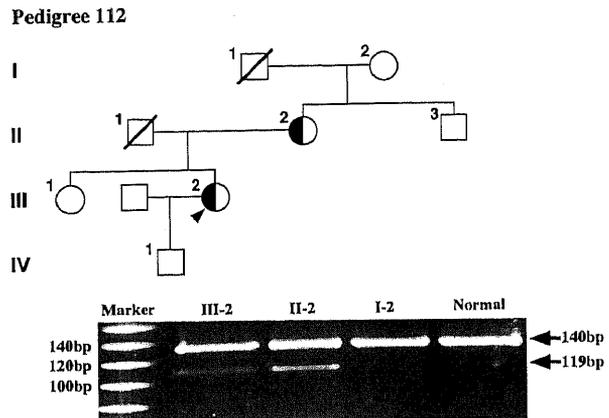


Fig. 5. The pedigree and the result of PCR-RFLP analysis of family 112. The arrows in the pedigree indicate the probands. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. I, II, III, IV, indicate generations. ♂, diseased; □, the Gly733Glu mutation (heterozygote) present, clinically affected; Digestion of the PCR products with Ksp632I generates polymorphic restriction fragments of 140bp and / or 119bp. The proband and her mother (II-1) show both 140bp and 119bp fragments, which indicate the heterozygotes for Gly733Glu mutation.

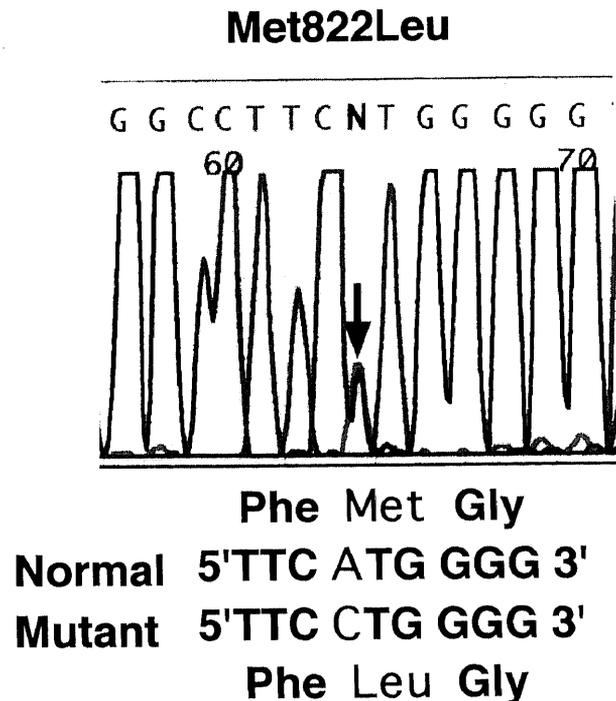


Fig. 6. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 22 of the human cardiac β MHC gene. The arrow indicates C peak of the mutant and A peak of the wild type.

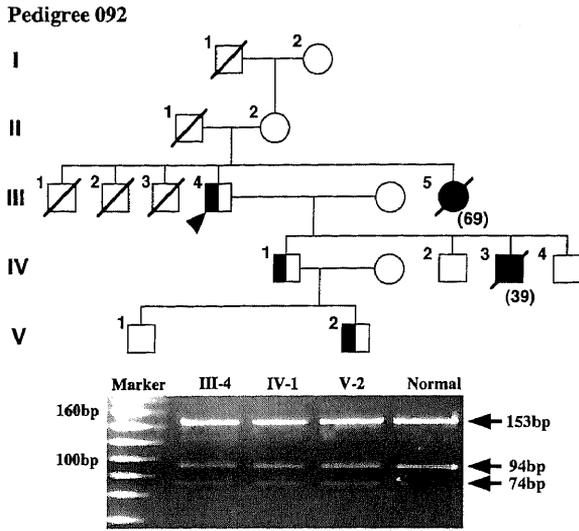
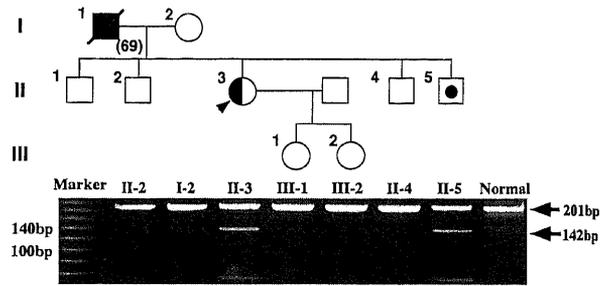


Fig. 7. The pedigree and the result of PCR-RFLP analysis of 092 family. The arrows in the pedigree indicate the probands. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. I, II, III, IV, V, indicate generations. \square , deceased; \blacksquare , the Met822Leu mutation (heterozygote) present, clinically affected; \blacksquare , sudden death, the age of death is indicated; Digestion of the PCR products with Mva I generates polymorphic restriction fragments of 94bp and / or 74bp. The proband, his son (IV-1) and his grand son (V-2) show both 30bp and 20bp fragments, which indicate the heterozygotes for Met822Leu mutation.

Pedigree 050



Pedigree 145

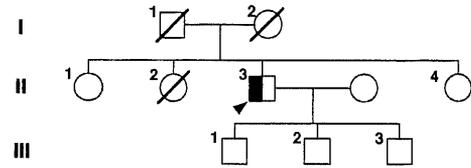
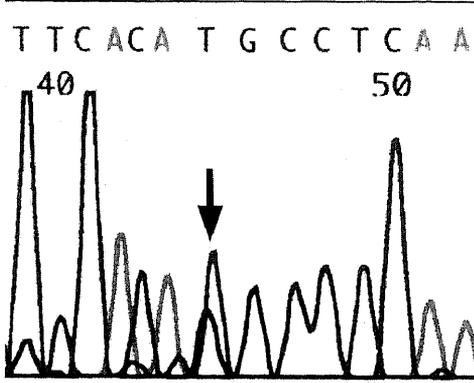


Fig. 9. The pedigree of family 050 and 145 and the result of PCR-RFLP analysis of family 050. The arrows in the pedigree indicate the probands. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. I, II, III indicate generations. \square , deceased; \blacksquare , the Arg858Cys mutation (heterozygote) present, clinically affected; \square , mutation present, clinically unaffected; \blacksquare , sudden death, the age of death is indicated; Digestion of the PCR products with NlaIII generates polymorphic restriction fragments of 201bp and/or 142bp. The proband050 and her brother (II-5) show both 201bp and 142bp fragments, which indicate the heterozygotes for Arg858Cys mutation.

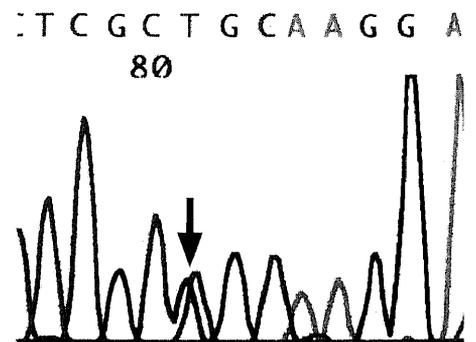
Arg858Cys



Thr Arg Leu
 Normal 5'ACA CGC CTC 3'
 Mutant 5'ACA TGC CTC 3'
 Thr Cys Leu

Fig. 8. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 22 of the human cardiac β MHC gene. The arrow indicates T peak of the mutant and C peak of the wild type.

Arg870Cys



Arg Arg Lys
 Normal 5'CGC CGC AAG 3'
 Mutant 5'CGC TGC AAG 3'
 Arg Cys Lys

Fig. 10. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 22 of the human cardiac β MHC gene. The arrow indicates T peak of the mutant and C peak of the wild type.

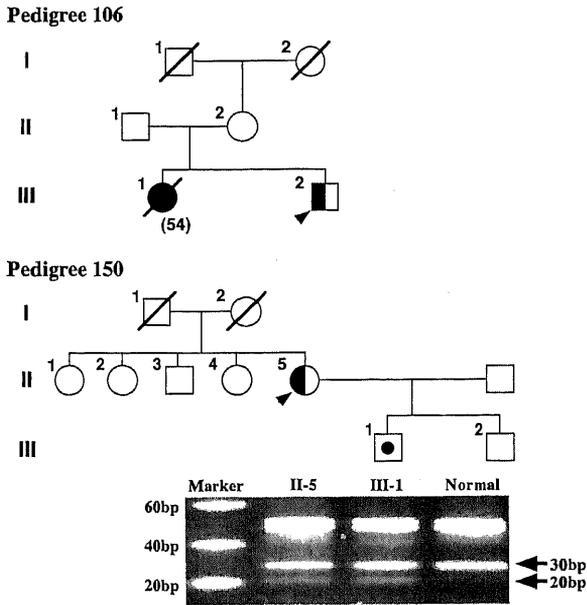


Fig. 11. The pedigree of family 106 and 150 and the result of PCR-RFLP analysis of family 150. The arrows in the pedigree indicate the probands. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. I, II, III indicate generations. \square , diseased; \blacksquare , the Arg870Cys mutation (heterozygote) present, clinically affected; \square , mutation present, clinically unaffected; \blacksquare , sudden death, the age of death is indicated; Digestion of the PCR products with AluI generates polymorphic restriction fragments of 30bp and/or 20bp. The proband150 and her son (III-1) show both 30bp and 20bp fragments, which indicate the heterozygotes for Arg870Cys mutation.

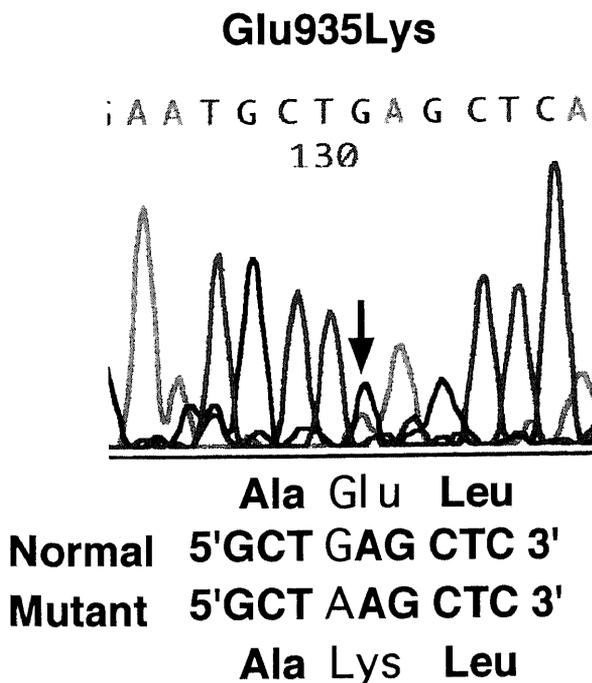


Fig. 12. Automated fluorescent direct sequencing of the exon 23 of the human cardiac β MHC gene. The arrow indicates A peak of the mutant and G peak of the wild type.

5. PCR制限酵素切断多型 (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 法

変異配列が決定された後、変異の存在の確認およびスクリーニングのため、変異の存在下でのみ切断部位が生じるように各変異ごとに特定の制限酵素を決定した。変異によっては、特定の制限酵素で切断部位が生じるようにプライマーを設計した(表2)。すなわち、一侧に通常のプライマーを、反対側に変異プライマーを用い、適当な温度条件を決定したうえで、PCR法により強制的に変異配列を導入したDNA断片を増幅した。PCR産物に各変異ごとに特定の制限酵素とその反作用緩衝液を加え、酵素の至適温度条件および至適時間にて反応させた。反応産物を10-20%濃度勾配アクリルアミドゲルに適当な鎖長マーカーと共に泳動して、切断の有無で変異の検出を行った。

6. 家系内調査

心筋β MHC遺伝子変異が認められた家系においては、家系図を作成した後家族に調査への協力を依頼し、同意が得られた家族に対して心電図および心臓超音波の各検査とDNA採取のための採血を施行した。

成 績

I. 心筋β MHC遺伝子解析

1. PCR-SSCP法の結果

対象症例であるHCM発端者168名に対して、PCR-SSCP法にて心筋β MHC遺伝子のエクソン3~24の塩基配列の多型を検索した結果、エクソン3において2人、エクソン7+8において1人、エクソン20において1人、エクソン22aにおいて1人、エクソン22bにおいて4人、エクソン23において1人の合わせて10人に異常バンドが認められた。

2. 直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列の決定

1) 発端者125の心筋β MHC遺伝子エクソン3における塩基配列解析の結果、この異常は26番目のAlaをコードするGCGがGTGへと変化し、Valに置換される変異(Ala26Valと標記)のヘテロ接合体であった(図1)。同一の変異が、発端者138にも認められた。両者の家系図を図2に示す。PCR-RFLP法による

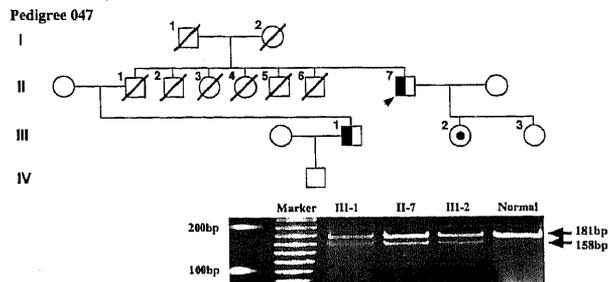


Fig. 13. The pedigree and the result of PCR-RFLP analysis of family 047. The arrows in the pedigree indicate the probands. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. I, II, III, IV indicate generations. \square , diseased; \blacksquare , the Glu935Lys mutation (heterozygote) present, clinically affected; \square , mutation present, clinically unaffected; Digestion of the PCR products with Hind III generates polymorphic restriction fragments of 181bp and/or 158bp. The proband, his nephew (III-1) and his daughter (III-2) show both 181bp and 158bp fragments, which indicate the heterozygotes for Glu935Lys mutation.

発端者家系内での変異の確認を行ったところ、発端者125の15歳の長女III-1も同一の遺伝子変異のヘテロ接合体であった(図2)。

2) 発端者034の心筋 β MHC遺伝子エクソン7+8における塩基配列解析の結果、この異常はエクソン7における200番目のAlaをコードするGCGがACCへと変異し、Thrに置換される変異(Ala200Thrと標記)のヘテロ接合体であった(図3)。本変異は、これまでに報告がなく新変異であった。

3) 発端者112の心筋 β MHC遺伝子エクソン20における塩基配列解析の結果、この異常は733番目のGlyをコードするGGAがGAAへと変異し、Gluに置換される変異(Gly733Gluと標記)のヘテロ接合体であった(図4)。本変異は、これまでに報告がなく新変異であった。PCR-RFLP法による発端者家系内での変異の確認を行ったところ、発端者の65歳の母親II-2も同一の遺伝子変異のヘテロ接合体であった(図5)。

4) 発端者092の心筋 β MHC遺伝子エクソン22aにおける塩基配列解析の結果、この異常は822番目のMetをコードするATGがCTGへと変異しLeuに置換される変異(Met822Leuと標記)のヘテロ接合体であった(図6)。本変異は、これまでに報告がなく新変異であった。PCR-RFLP法による発端者家系内での変異の確認を行ったところ、発端者の49歳の長男IV-1と22歳の孫V-2も同一の遺伝子変異のヘテロ接合体であった(図7)。

5) 発端者050の心筋 β MHC遺伝子エクソン22bにおける塩基配列解析の結果、この異常は858番目のArgをコードするCGCがTGCへと変異しCysに置換される変異(Arg858Cysと標記)のヘテロ接合体であった(図8)。本変異は、これまでに報告がなく新変異であった。同一の変異が発端者145にも認めら

れた。両者の家系図を図9に示す。PCR-RFLP法による発端者家系内での変異の確認を行ったところ、発端者050の48歳の弟II-5も同一の遺伝子変異のヘテロ接合体であった(図9)。

6) 発端者106の心筋 β MHC遺伝子エクソン22bにおける塩基配列解析の結果、この異常は870番目のArgをコードするCGCがTGCへと変異しCysに置換される変異(Arg870Cysと標記)のヘテロ接合体であった(図10)。同一の変異が発端者150にも認められた。両者の家系図を図11に示す。PCR-RFLP法による発端者家系内での変異の確認を行ったところ、発端者150の45歳の長男III-1も同一の遺伝子変異のヘテロ接合体であった(図11)。

7) 発端者047の心筋 β MHC遺伝子エクソン23における塩基配列解析の結果、この異常は935番目のGluをコードするGAGがAAGへと変異し、Lysに置換される変異(Glu935Lysと標記)のヘテロ接合体であった(図12)。PCR-RFLP法による発端者家系内での変異の確認を行ったところ、発端者の62歳の甥III-1と49歳の長女III-2も同一の遺伝子変異のヘテロ接合体であった(図13)。

Ala200Thr, Gly733Glu, Met822Leu, Arg858Cysの4種類の新変異については、家族歴を有さず心電図所見および心臓超音波所見に異常を認めない100名を対照として調査したところ、いずれの変異も認められなかった。

II. 各遺伝子変異における臨床像の検討

各遺伝子変異を認めた者の心臓超音波所見を表3に、心電図所見を表4に示す。

1. 遺伝子変異Ala26Val変異の臨床像

心臓超音波検査にて発端者125は心室中隔の肥厚を認め、

Table 3. Echocardiographic findings in the affected individuals with each mutation in the cardiac β MHC gene

Mutation	Affected Exons	Family	No.	Gender	Age (yr)	IVSth (mm)	PWth (mm)	IVSth/pWth	ASH	LVDd (mm)	LVDs (mm)	FS (%)	D-HCM like Feature
Ala26Val	3	F-125	II-2	M	45	16	10	1.6	+	44	27	39	-
			III-1	F	15	11	11	1.0	-	41	27	34	-
			F-138	II-2	M	73	23	13	1.8	+	40	25	38
Ala200Thr	7	F-034	II-1	M	50	15	11	1.4	+	48	32	33	-
Gly733Glu	20	F-112	II-2	F	65	7	10	0.7	-	69	60	13	+
			III-2	F	34	25	12	2.1	+	38	20	47	-
Met822Leu	22	F-092	III-4	M	76	10	9	1.1	-	61	52	15	+
			IV-1	M	49	11	11	1.0	-	51	39	24	+
			V-1	M	22	22	9	2.4	+	42	23	45	-
Arg858Cys	22	F-050	II-3	F	56	16	11	1.5	+	47	25	47	-
			II-5	M	48	10	10	1.0	-	47	27	43	-
			F-145	II-3	M	65	25	12	2.1	+	52	30	42
Arg870Cys	22	F-106	III-3	M	52	20	11	1.8	+	43	23	47	-
			F-150	II-5	F	75	14	10	1.4	+	39	23	41
Glu935Lys	23	F-047	II-7	M	75	17	9	1.9	+	49	36	27	-
			III-2	F	49	11	11	1.9	-	44	28	36	-

IVSth, interventricular septal wall thickness; PWth, left ventricular posterior wall thickness; ASH, asymmetrical septal hypertrophy; LVDd, left ventricular end-diastolic dimension; LVDs, left ventricular end-systolic dimension; FS, fractional shortening; D-HCM like Features, dilated cardiomyopathy-like features; M, male; F, female; +, presence of a finding; -, absence of a finding.

ASHを呈していた。また、左室内腔の拡大は認められず、左室収縮能は保たれていた。心電図所見では、II, III, aVFに異常Q波を認めた。これに対し、15歳の長女III-1は左室壁肥厚を認めず、左室収縮能は正常であった。また、心電図所見でも異常を認めなかった。発端者138ではASHを認め、特に心尖部に肥厚が著しかった。また、左室内腔の拡大を認めず、左室収縮能は保たれていた。心電図所見ではII, III, aVFおよび胸部誘導に陰性T波が認められ、特にV3, V4では巨大陰性T波を呈していた。いずれの家系にも突然死例は認められなかった。

2. 遺伝子変異Ala200Thr変異の臨床像

発端者034は、心臓超音波上心室中隔壁厚15mm、左室後壁厚11mmとASHを呈していた。左室拡張末期径48mmと左室内腔の拡大は認められず、左室内径短縮率 (fractional shortening, FS) 33%と左室収縮能も保たれていた。心電図では、I, aVL, V4, V5に陰性T波が認められた。この家系にも突然死例は認められなかった。

3. 遺伝子変異Gly733Glu変異の臨床像

発端者112とその母親II-2における心臓超音波所見では、34歳の発端者は心室中隔壁厚25mm、左室後壁厚12mmとASHを呈しており、左室内腔の拡大を認めず、左室収縮能は保たれていた。これに対し、65歳の母親は心室中隔壁厚7mm、左室後壁厚10mmと壁は菲薄化し、左室拡張末期径は69mmと拡大していた。FSは13%と左室収縮能が著しく低下し、拡張型心筋

症様の病態を呈していた。この母親は40歳頃から心不全を発症し、徐々に増悪傾向がみられている。心電図所見では、発端者に完全右脚ブロックが認められ、母親に心室内伝導障害が認められた。この家系においても突然死は認められなかった。発端者の祖母I-2には遺伝子変異を認めず、祖父は35歳で戦死している。

4. 遺伝子変異Met822Leu変異の臨床像

76歳の発端者は、心室中隔壁厚10mm、左室後壁厚9mmと壁肥厚を認めなかった。左室拡張末期径は61mmと拡大し、左室収縮能はFS15%と低下して拡張型心筋症様の病態を呈していた。この発端者は72歳頃より心不全を発症し、急性増悪を繰り返している。49歳の長男IV-1も心室中隔壁厚11mm、左室後壁厚11mmと壁肥厚を認めず、左室拡張末期径51mm、FS24%と左室内腔の軽度拡大と左室収縮能の低下を認めた。この長男は、これまでのところ無症状で経過している。一方22歳の孫V-2は、心室中隔壁厚22mm、左室後壁厚9mmと壁肥厚を認め、ASHを呈していた。また、心室拡張末期径42mm、FS45%と左室内腔の拡大は認められず、左室収縮能は保たれていた。心電図所見では、発端者は徐脈性心房細動のため75歳でペースメーカー植え込み術が施行されていた。49歳の長男は、I, II, aVL, aVF, V4, V5, V6に陰性T波を認めた。また、22歳の孫には完全右脚ブロックと著しい左室肥大の所見が認められた。この家系では発端者の妹III-5が69歳で突然死し、また発

Table 4. Electrocardiographic findings in the affected individuals with each mutation in the cardiac β MHC gene

Mutation	Affected Exons	Family	No.	Gender	Age (yr)	Rhythm	Abnormal Q	QRS				ST-T Change	
								Width (sec)	SV1 (mV)	SV1 (mV)	SV1+SV5 (mV)		
Ala26Val	3	F-125	II-2	M	45	SR	+	0.09	2.7	0.7	3.4	NT in aVL	
			III-1	F	15	SR	-	0.08	1.0	1.2	2.2	Normal	
			F-138	II-2	M	73	SR	-	0.10	1.3	2.6	3.9	NT in II,III,aVF,V5,V6 GNT in V3,V4
Ala200Thr	7	F-034	II-2	M	50	SR	+	0.12	0.6	3.0	3.6	NT in I,aVL,V4,V5	
Gly733Glu	20	F-112	II-2	F	65	SR	-	0.14	1.1	0.5	1.6	NT in I,aVL	
			III-2	F	34	SR	-	0.14	1.0	1.8	2.8	NT in III,V1,V2,V3	
Met822Leu	22	F-092	III-4	M	76	Af, PMR	*	*	*	*	*	*	
			IV-1	M	49	SR	-	0.10	1.8	2.3	4.1	NT in I,II,aVL,aVF,V4~V6	
			V-1	M	22	SR	-	0.12	0.9	3.4	4.3	NT in I,II,III,aVF,V1~V6	
Arg858Cys	22	F-050	II-3	F	56	SR	+	0.09	1.0	1.7	2.7	Normal	
			II-5	M	48	SR	-	0.08	0.8	1.1	1.9	Normal	
			F-145	II-3	M	65	SR	-	0.10	2.4	3.0	5.4	NT in I,aVL,V5,V6
Arg870Cys	22	F-106	III-3	M	52	SR	+	0.10	1.2	1.9	3.1	NT in I,aVL	
			F-150	II-5	F	75	SR	+	0.10	0.4	1.1	1.5	NT in III
			III-1	M	45	SR	-	0.08	1.0	1.5	2.5	Normal	
Glu935Lys	23	F-047	II-7	M	75	SR	-	0.12	1.4	1.5	2.9	NT in I,aVL,V4~V6	
			III-1	M	62	SR	+	0.12	1.6	2.0	3.6	NT in I,II,aVL,aVF,V4~V6	
			III-2	F	49	SR	-	0.08	1.4	1.4	2.8	Normal	

SR, sinus rhythm; Af, atrial fibrillation; PMR, pacemaker rhythm; SV1, amplitude of S wave in V1 lead; RV5, amplitude of R wave in V5 lead; NT, negative T; GNT, giant negative T; M, male; F, female; +, presence of a finding; -, absence of a finding; *, impossible to assess the findings.

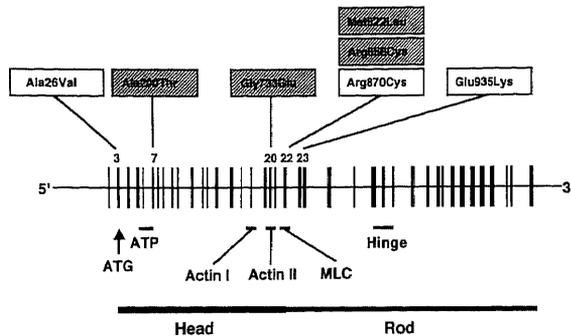


Fig. 14. Mutations in the β MHC gene found in the patients with HCM in Hokuriku district. Mutations are indicated above the schematic representation of the β MHC gene. Mutations described in shaded squares are new mutations. The domain structure corresponding to each exon is shown. Sequences that encode the initiation of transcription (ATG), ATPase activity (ATP), actin binding (Actin I and Actin II), myosin light-chain binding (MLC), and hinge function (Hinge) are indicated.

端者の三男IV-3も39歳で突然死している。

5. 遺伝子変異Arg858Cys変異の臨床像

発端者050は心室中隔壁厚16mm, 左室後壁厚11mmと壁肥厚を認め, ASHを呈していた。また, 左室拡張末期径は47mmと正常で, FS47%と左室収縮能も保たれていた。心電図所見では, I, aVL, V4, V5, V6に異常Q波を認めた。これに対し48歳の弟II-5は, 左室壁厚, 左室内腔は正常で, 左室収縮能も保たれていた。また, 心電図所見でも異常を認めなかった。一方, 発端者145ではASHを認め, 左室収縮能は保たれていた。心電図では, I, aVL, V5, V6に陰性T波と左室肥大の所見を認めた。家系050では, 発端者の母親I-2には遺伝子異常は認められず, 父親I-1は69歳で突然死している。一方, 家系145では突然死例は認められなかった。

6. 遺伝子変異Arg870Cys変異の臨床像

発端者106ではASHが認められ, 左室内腔は正常で, 左室収縮能も保たれていた。心電図ではI, aVLの陰性T波とIII, aVFの異常Q波が認められた。発端者150でもASHを認め, 左室内腔の拡大は認められず, 左室収縮能は保たれていた。心電図所見では, I, aVLの異常Q波が認められた。これに対し発端者150の45歳の長男III-1は, 心電図所見上異常が認められなかった。家系106では, 発端者の姉III-1が54歳で突然死している。家系150では突然死例は認めなかった。

7. 遺伝子変異Glu935Lys変異の臨床像

75歳の発端者は心室中隔壁厚17mm, 左室後壁厚9mmとASHを呈していた。左室拡張末期径49mmと左室内腔の拡大は認められなかったが, FS27%と左室収縮能は軽度低下していた。発端者の54歳時の心臓超音波所見では, 心室中隔壁厚16mm, 左室後壁厚9mm, 左室拡張末期径43mm, FS37%であった。54歳時と比較すると, 著明であった心尖部の壁肥厚が退縮し, 左室拡張末期径が軽度拡大して, 左室収縮能が低下していた。心電図においては, 54歳時V4で巨大陰性T波を認めたが, 現在は消退している。発端者の62歳の甥III-1では, 心電図上I, II, aVL, aVF, V4, V5, V6の陰性T波とaVLに異常Q波が認められた。発端者の49歳の娘III-2では, 心電図上異常を認めなかった。また, 心臓超音波検査上左室壁肥厚は認められず,

左室収縮能も保たれていた。本家系には, 突然死例は認めない。

考 察

家族性HCMの原因遺伝子異常として, Geisterfer-Lowranceら⁶⁾によって1990年に初めて心筋 β MHC遺伝子の点変異が報告されてからこれまでに40種類以上の点変異と2種類の欠失変異, さらに1種類の挿入-欠失変異が報告されている⁷⁻³³⁾。これらは心筋 β MHCの尾部における一種類の広範囲な欠失変異以外, すべて心筋 β MHCのヘッドからヘッド-ロッド接合部をコードする遺伝子の部位に存在している。本研究では, 心筋 β MHCのヘッド, ヘッド-ロッド接合部をコードする遺伝子の領域を完全に含むエクソン3からエクソン24までについて検討を行った。

HCMの原因遺伝子として, 今日までに心筋 β MHC遺伝子を始め心筋TnT遺伝子, 心筋 α TM遺伝子, 心筋MBPC遺伝子など少なくとも9種類の遺伝子が報告されている³⁴⁾⁻⁴³⁾。これらはすべて心筋収縮の基本単位であるサルコメアを構成する蛋白の遺伝子であることから, HCMはサルコメア病であると考えられるに至った。従って, HCMの定義に関しても, 1995年のWHO/ISFC Task Forceによる心筋症の定義⁵⁷⁾から原因不明な疾患であるという条件が削除された。これまで報告された9種類の遺伝子のうち心筋 β MHC遺伝子異常が最も頻度が高く, 欧米人で約20%~30%³⁵⁾, 日本人においても20%から25%程度と報告されている⁶¹⁾。しかしその一方で, 地域により頻度に大きな差があることも報告されている。Kimuraら⁶²⁾は日本の関東, 近畿, 四国, 九州の4つの地域で検討し, 家族性HCMにおける心筋 β MHC遺伝子異常の頻度は, 最も高い関東で25.0%, 最も低い近畿で14.2%という地域差があったと報告している。また, 九州では心筋 β MHCが19.4%であったのに対し, 心筋TnT遺伝子異常が20.9%と β MHCより高い頻度で認められた。さらに, Jaaskelainenら⁵⁹⁾はフィンランドにおける家族性HCMの原因遺伝子異常の検討で, 心筋 β MHCの頻度が6%であったのに対し心筋 α TMが25%認められ, 心筋 β MHCが最も頻度の高い原因遺伝子ではなかったと報告している。今回の著者の検討では, 北陸地方におけるHCMの発端者168名中心筋 β MHC遺伝子異常が認められたのは10名で, その頻度は6.0%とこれまで日本人において報告されている頻度より低かった。従って, 北陸地方においては心筋 β MHC以外の遺伝子異常の頻度が高い可能性が示唆された。

心筋 β MHCの遺伝子型とHCMの予後の関係に関する検討では, まず遺伝子変異に電荷変化が伴っているか否かが注目された。すなわち, Arg403Gln, Arg453Cys, Arg719Trpの様に電荷変化を伴う変異は突然死が多発し予後不良であるのに対し, Phe513Cys, Val606Met, Leu908Valの様に電荷変化を伴っていない変異は予後良好であるとする報告がWatkinsら¹³⁾やEpsteinら⁸⁾によって相次いでなされた。しかし, その後Fanapanazirら⁴⁸⁾はVal606Metで突然死の多発する家系やArg403Glnで突然死も失神発作も認めない家系を報告した。また, Semsarianら⁶³⁾もVal606Metで14歳の突然死を認めた家系を報告し, 予後良好とはいえないと述べている。このように, 電荷変化の有無と予後との関連については, 現在意見の一致がみられていない。

一方, 心筋 β MHCの立体構造上の変異の位置と予後の関係

について注目されるようになった。Kimuraら⁶¹⁾は、心筋 β MHCにおいてATP結合部位、アクチン結合部位、ミオシン軽鎖結合部位が立体構造上特に重要な機能部位であるとし、これらの領域に変異が存在する場合は疾患浸透率が高く、予後も不良であると報告している。今回著者は、HCMにおける原因遺伝子異常として4種類の新変異を含む7種類の点変異を検出した(図14)。このうち、突然死症例がMet822Leu, Arg858Cys, Arg870Cysの各変異を有する家系に認められた。Arg858Cys, Arg870Cysには1価の電荷変化が伴うがMet822Leuは電荷変化を伴わない。しかしながら、Met822Leu家系には39歳の突然死など複数の突然死症例が存在している。また、発端者が拡張相肥大型心筋症へ移行して心不全を発症しており、その長男も拡張相への移行状態にあることから、予後不良な遺伝子変異と考えられる。心筋 β MHCにおける立体構造上Met822Leuはミオシン軽鎖との相互作用部位に存在し、機能上重要な部位における変異と考えられた。それに対し、Ala26Val, Glu935Lys家系には突然死や失神発作の既往のある症例を認めず、また拡張相を呈する症例も認めなかった。Ala26Valは電荷変化を伴わないが、Glu935Lysは2価の電荷変化を伴っている。しかしながら、これらは、ATP結合部位、アクチン結合部位、ミオシン軽鎖結合部位といった重要な機能部位以外の部位に存在していた。また、Gly733Gluは1価の電荷変化を伴いアクチン結合部位近傍に位置している。これとごく近い位置にあるPro731Leu変異に関する報告⁶⁰⁾では、電荷変化を伴わないがアクチン結合部位近傍に位置し、拡張相肥大型心筋症例や複数の突然死例を認め予後不良であると述べられている。著者のGly733Gluを検出した家系では明らかな突然死例は認めなかったが、発端者の母親が拡張相肥大型心筋症を呈し40歳代から心不全を発症している。さらに、Ala200Thrは電荷変化を伴わず、ATP結合部位の極近傍に位置している。これに比較的近いATP結合部位における変異Arg190Thrで若年の突然死や心不全症例を認める家系⁶⁵⁾が報告されているが、Ala200Thrでは突然死例や心不全症例は認めない。

このように著者の検出した遺伝子変異例でも電荷変化の有無と予後にはっきりした関連は認められなかったが、重要な機能部位に位置する変異例で突然死例や心不全例が認められる予後不良の家系が存在した。これらのことから、心筋 β MHC遺伝子変異と臨床病型の関係では、電荷変化の有無よりも変異の存在する部位の機能がより強く関係しているものと推測された。しかしながら、機能的に重要な部位に位置する変異例でも突然死を認めず浸透率の低い家系が存在するとの報告²¹⁾もあり、また、心筋 β MHCの同一の遺伝子変異でも家系によっては異なった臨床像を示すことも報告⁴⁸⁾されており、今後さらに詳細な検討が必要と思われる。

HCMの頻度はおよそ500人に1人と報告⁶⁶⁾されており、突然死の原因の多くをHCMが占めているという点で臨床的に重要視されている。特に若年者の突然死の第一位がHCM⁶⁷⁾であり、その多くが運動競技中の突然死⁶⁸⁾であると報告されている。従ってHCMにおける原因遺伝子解明の目的の一つは、遺伝子型と臨床像および予後、特に突然死との関係を明らかにすることである。

著者の検討した症例において、Arg870Cys変異のF-106の家系では突然死例がみられたが、同一変異のF-150の家系では突然死症例はなく、変異陽性で未発症の45歳の男性が存在した。

また、Arg858Cys変異のF-050の家系では突然死例がみられる一方、同一家系内で変異陽性で未発症の48歳の男性が存在した。このような中年以降の未発症例について、今後の発症の可能性や突然死の危険性について考慮する必要がある。HCM症例では早ければ4歳未満で既に壁肥厚が出現し、多くは成長期の終了する20歳頃までには壁肥厚が出現すると報告されていた^{69)~71)}。しかしながら、遺伝子解析がすすむにつれて遺伝子型と表現型の関係が徐々に明らかにされ、心筋MBPC遺伝子異常では40歳以降の遅発性の発症が多いことが報告された⁷²⁾。心筋 β MHCの異常では遅発性の発症は多くはないが、欠尖変異を有する家系で59歳の遅発性発症の報告¹¹⁾があり、遺伝子変異陽性例では高齢になっても発症の可能性が否定できないと考えられる。また、HCMの家系内で明らかな壁肥厚が認められなかった者が突然死し、剖検により心筋の錯綜配列が認められたという報告⁷³⁾もあり、心エコー図検査で異常がとらえられなくても突然死の危険性は存在し、注意を要するものと考えられる。また、心エコー図検査よりも心電図検査の方がより診断精度が高い⁷⁴⁾⁷⁵⁾ことから、遺伝子変異陽性例では年齢に関係なく心電図を基本として、心エコー図を併せた経過観察を継続していく必要があるものと考えられる。

心筋 β MHCの遺伝子変異からHCMが発症する機序に関しては、変異による心筋線維の機能的収縮異常から二次的に心肥大が発症すると考えられている⁷⁶⁾。各遺伝子ごとに肥厚の程度が比較検討され、心筋TnT遺伝子変異例では最大壁厚の平均が 16.7 ± 5.5 mmと肥厚の程度が軽かったのに対し、心筋 β MHC遺伝子変異例では最大壁厚が平均 23.7 ± 7.7 mmと肥厚の程度が強いと報告されている³⁵⁾。今回の著者の β MHC遺伝子変異例では壁肥厚が最大25mmと同様の結果であったが、突然死の危険度の高いとされる35mm以上の肥厚の強い症例⁷¹⁾は存在しなかった。また、左室流出路に圧較差を認め、心エコー図上僧帽弁の収縮期前方運動(systolic anterior motion, SAM)を認めるHOCMも存在しなかった。HCMの特徴の一つであるASHのような不均一な肥厚をきたす理由、また、同一の遺伝子変異でも異なった肥厚形態を呈する理由など未だ不明な点が多く、遺伝子型と壁肥厚に関しては今後さらなる研究が必要である。

拡張相肥大型心筋症については、HCMの4~12%がその経過中に移行すると報告されている^{50)~55)}。病理組織学的には広範な心筋の線維化がみられ、これが左室収縮不全をもたらすと考えられているが、HCMから拡張相肥大型心筋症へ移行する機序は未だ明らかになっていない。Kogaら⁷⁷⁾は、 β MHC遺伝子変異よりもTnT遺伝子変異のほうが拡張相に移行しやすく、50歳以上の症例では42%が拡張相に移行したと報告している。これに対し β MHC遺伝子変異では、拡張相に移行する率が比較的高いといわれているArg403Glnで11~17%程度と報告されている⁴⁸⁾。今回の症例では、 β MHC遺伝子変異が認められたもののうち明らかに拡張相肥大型心筋症と考えられたのは13%であり、これまでの報告とほぼ一致した。発端者が初診時すでに拡張相を呈している場合、拡張相肥大型心筋症と診断するには経過中に明らかなHCMを呈した時期があったことを確認するか、または同一家系内にHCM症例の存在を確認する必要がある。これらが明確でない場合は、拡張型心筋症と誤診される可能性がある。今回著者の見出したMet822LeuのF-092の家系でも、発端者は初診時拡張型心筋症と診断されていた。この家系では、発端者の49歳の長男も拡張相への移行段階に

あると考えられ、現在ASHを呈している22歳の孫とともに慎重な経過観察が必要と考えられる。

著者の検出したGlu935LysのF-047の発端者は21年の長期間経過観察されているが、初診時には心尖部に肥厚が強く、心電図上は巨大陰性T波が認められた。しかしながら、経過中に心尖部の肥厚は消滅し、心電図上の巨大陰性T波も消失した。心尖部肥大型心筋症は、その形態的特徴のほか、日本人に多く、家族歴が明らかでない症例が多いなどの特徴からHCMとは別の疾患であるという考え⁴⁵⁾⁴⁶⁾もあった。しかし、遺伝子解析が進むなかで心尖部肥大型心筋症例36例中3例(8.3%)に心筋TnI遺伝子変異を認めたと報告された⁴¹⁾。このことから、心尖部肥大型心筋症と考えられている症例の少なくとも一部は、サルコメア遺伝子異常としてのHCMであると考えられる。

以上のように、HCMの遺伝子解析が進歩したことにより遺伝子異常を検出することがHCMの最終診断となりつつある。これまでの診断基準では心筋肥大をきたす可能性のある合併症、たとえば高血圧を合併している場合にはHCMと診断することは極めて困難であった。また、心エコー図などによる形態学的な鑑別も困難であった。しかしながら、サルコメア遺伝子異常が検出されれば、高血圧などを合併していてもHCMと診断する事が可能となる。また、拡張相を呈し臨床的にHCMであることを証明するのが困難な症例にも遺伝子解析が有用である。しかしながら、HCMの約50%は未だ原因遺伝子が不明であり、遺伝子診断を最終診断とするためにはこれらの解明が急がれる。また、遺伝子解析のこれまでの報告は欧米や日本などに偏っており、遺伝子異常と臨床像の関係を明らかにするためにはさらに多くの症例と個々の症例の長期にわたるデータの蓄積が必要であろう。

結 論

日本人肥大型心筋症における心筋 β ミオシン重鎖遺伝子変異をPCR-SSCP法、直接塩基配列決定法およびPCR-RFLP法を用いて検討し、以下の結果を得た。

1. 臨床的に肥大型心筋症と診断された北陸地方在住の発端者からAla26Val, Ala200Thr, Gly733Glu, Met822Leu, Arg858Cys, Arg870Cys, Glu935Lysの7種類の心筋 β ミオシン重鎖遺伝子変異が確認された。このうちAla200Thr, Gly733Glu, Met822Leu, Arg858Cys, の4種類はこれまでに報告がなく新変異であった。

2. 拡張相肥大型心筋症がGly733Glu, Met822Leuの各遺伝子変異を有する家系に、また、突然死がMet822Leu, Arg858Cys, Arg870Cysの各遺伝子変異を有する家系に認められた。Gly733Gluはアクチン結合部位近傍に存在し、Met822Leu, Arg858Cys, Arg870Cys, はミオシン軽鎖結合部位近傍に位置しており、重要な機能部位に位置する変異例で予後不良の傾向が認められた。

3. 北陸地方の肥大型心筋症における心筋 β ミオシン重鎖遺伝子変異の頻度は6.0%であった。これは、これまで報告されていた日本人における頻度より低く、北陸地方の肥大型心筋症の原因遺伝子変異は心筋 β ミオシン重鎖以外の頻度が高いと考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御高閲を賜りました恩師 馬淵 宏教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を当初より直接御指導、御教

示頂きました金沢大学医学部医学科内科学第二講座の清水賢巳助教授に心から謝意を表します。また、多大なる御協力を頂きました金沢大学医学部医学科内科学第二講座第四研究室の各位、ならびに高分子DNAの採取に際し御協力を頂いた山本幸夫氏、池多亜沙子氏、谷口尊子氏に感謝致します。また、貴重な症例を御紹介頂いた平井淳一先生(福井県立病院)、水野清雄先生、新井芳行先生(福井循環器病院)に感謝致します。

本研究の一部は第63回日本循環器学会学術集会(1999年、東京)において発表した。

文 献

- 1) Maron BJ, Epstein SE. Hypertrophic cardiomyopathy: a discussion of nomenclature [editorial]. *Am J Cardiol* 43: 1242-1244, 1979
- 2) Maron BJ, Roberts WC. Quantitative analysis of cardiac muscle cell disorganization in the ventricular septum of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 59: 689-706, 1979
- 3) Maron BJ, Nichols PFD, Pickle LW, Wesley YE, Mulvihill JJ. Patterns of inheritance in hypertrophic cardiomyopathy: assessment by M-mode and two-dimensional echocardiography. *Am J Cardiol* 53: 1087-1094, 1984
- 4) Jarcho JA, McKenna W, Pare JA, Solomon SD, Holcombe RF, Dickie S, Levi T, Donis-Keller H, Seidman JG, Seidman CE. Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. *N Engl J Med* 321: 1372-1378, 1989
- 5) Matsuoka R, Yoshida MC, Kanda N, Kimura M, Ozasa H, Takao A. Human cardiac myosin heavy chain gene mapped within chromosome region 14q11.2-q13. *Am J Med Genet* 32: 279-284, 1989
- 6) Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* 62: 999-1006, 1990
- 7) Tanigawa G, Jarcho JA, Kass S, Solomon SD, Vosberg HP, Seidman JG, Seidman CE. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: an alpha/beta cardiac myosin heavy chain hybrid gene. *Cell* 62: 991-998, 1990
- 8) Epstein ND, Cohn GM, Cyran F, Fananapazir L. Differences in clinical expression of hypertrophic cardiomyopathy associated with two distinct mutations in the beta-myosin heavy chain gene. A 908Leu-Val mutation and a 403Arg-Gln mutation. *Circulation* 86: 345-352, 1992
- 9) Fananapazir L, Dalakas M, Cyran F, Cohn G, Epstein N. Central core disease is present in hypertrophic cardiomyopathy patients with distinct mutations in the beta-myosin heavy chain gene [abstract]. *Circulation* 86 (suppl I): I-229, 1992
- 10) Harada H, Kimura A, Nishi H, Koga Y, Sasazuki Y, Toshima H. Genetic analysis of hypertrophic cardiomyopathy [abstract]. *Circulation* 86 (suppl I): I-591, 1992
- 11) Marian AJ, Yu QT, Mares A, Hill R, Roberts R, Perryman MB. Detection of a new mutation in the beta-myosin heavy chain gene in an individual with hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 90: 2156-2165, 1992
- 12) Nishi H, Kimura A, Harada H, Toshima H, Sasazuki T. Novel missense mutation in cardiac beta myosin heavy chain gene found in a Japanese patient with hypertrophic

- cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 188: 379-387, 1992
- 13) Watkins H, Rosenzweig A, Hwang DS, Levi T, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG. Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 326: 1108-1114, 1992
- 14) Cuda G, Fananapazir L, Zhu WS, Sellers JR, Epstein ND. Skeletal muscle expression and abnormal function of beta-myosin in hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 91: 2861-2865, 1993
- 15) Dausse E, Komajda M, Fetler L, Dubourg O, Dufour C, Carrier L, Wisnewsky C, Bercovici J, Hengstenberg C, Al-Mahdawi S, Isnard R, Hagege A, Bouhour JB, Desnos M, Beckmann JS. Familial hypertrophic cardiomyopathy. microsatellite haplotyping and identification of a hot spot for mutations in the beta-myosin heavy chain gene. *J Clin Invest* 92: 2807-2813, 1993
- 16) Harada H, Kimura A, Nishi H, Sasazuki T, Toshima H. A missense mutation of cardiac beta-myosin heavy chain gene linked to familial hypertrophic cardiomyopathy in affected Japanese families. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 791-798, 1993
- 17) Mares A, Grave G, Tapscott T, Roberts R. Screening and identification of known and novel mutations in hypertrophic cardiomyopathies based on molecular scanning with chemical cleavage [abstract]. *Circulation* 88 (suppl 1): I-572, 1993
- 18) Nishi H, Kimura A, Matsuyama K, Koga Y, Sasazuki T, Toshima H. Two distinct mutations of cardiac beta-myosin heavy chain gene found in a Japanese patient with hypertrophic cardiomyopathy [abstract]. *Circulation* 88 (suppl 1): I-343, 1993
- 19) Anan R, Greve G, Thierfelder L, Watkins H, McKenna WJ, Solomon S, Vecchio C, Shono H, Nakao S, Tanaka H, Mares A, Towbin JA, Spirito P, Roberts R, Seidman JG, Seidman CE. Prognostic implications of novel beta cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 93: 280-285, 1994
- 20) Consevage MW, Salada GC, Baylen BG, Ladda RL, Rogan PK. A new missense mutation, Arg719Gln, in the beta-cardiac heavy chain myosin gene of patients with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 3: 1025-1026, 1994
- 21) Dufour C, Dausse E, Fetler L, Dubourg O, Bouhour JB, Vosberg HP, Guicheney P, Komajda M, Schwartz K. Identification of a mutation near a functional site of the beta cardiac myosin heavy chain gene in a family with hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 26: 1241-1247, 1994
- 22) Fananapazir L, Winkler J, Satorius O, Epstein N. Identification of beta-myosin heavy chain gene mutations in 31 athletes with hypertrophic cardiomyopathy [abstract]. *Circulation* 90 (suppl 1): I-442, 1994
- 23) Nishi H, Kimura A, Harada H, Adachi K, Koga Y, Sasazuki T, Toshima H. Possible gene dose effect of a mutant cardiac beta-myosin heavy chain gene on the clinical expression of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 549-556, 1994
- 24) Toyo-oka T, Takazawa K, Kimura N, Inukai M, Wang YP. A novel mutation of myosin heavy chain gene from cardiac beta to foetal skeletal type in a family with HCM, DCM and sudden death: a report and discussion [abstract]. *Eur Heart J* 15 (suppl): 334, 1994
- 25) Arai S, Matsuoka R, Hirayama K, Sakurai H, Tamura M, Ozawa T, Kimura M, Imamura S, Furutani Y, Joh-o K, Kawana M, Takao A, Hosoda S, Momma K. Missense mutation of the beta-cardiac myosin heavy-chain gene in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Med Genet* 58: 267-276, 1995
- 26) Moolman JC, Brink PA, Corfield VA. Identification of a novel Ala797Thr mutation in exon 21 of the beta-myosin heavy chain gene in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mutat* 6: 197-198, 1995
- 27) Nakajima-Taniguchi C, Matsui H, Eguchi N, Nagata S, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. A novel deletion mutation in the beta-myosin heavy chain gene found in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 27: 2607-2612, 1995
- 28) Nishi H, Kimura A, Harada H, Koga Y, Adachi K, Matsuyama K, Koyanagi T, Yasunaga S, Imaizumi T, Toshima H, Sasazuki T. A myosin missense mutation, not a null allele, causes familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 91: 2911-2915, 1995
- 29) Kuang SQ, Yu JD, Lu L, He LM, Gong LS, Chen SJ, Chen Z. Identification of a novel missense mutation in the cardiac beta-myosin heavy chain gene in a Chinese patient with sporadic hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 28: 1879-1883, 1996
- 30) Rottbauer W, Grunig E, Brown B, Zehelein J, Schelfold T. A novel beta-myosin mutation in a large family suffering from dilated and hypertrophic cardiomyopathy [abstract]. *Circulation* 94 (suppl 1): I-162, 1996
- 31) Weist B, McKeown P, Uhl K, Vosberg HP. Candidate gene analysis of hypertrophic cardiomyopathy [abstract]. *J Mol Cell Cardiol* 28: A44, 1996
- 32) Charron P, Carrier L, Dubourg O, Tesson F, Desnos M, Richard P, Bonne G, Guicheney P, Hainque B, Bouhour JB, Mallet A, Feingold J, Schwartz K, Komajda M. Penetrance of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Genet Couns* 8: 107-114, 1997
- 33) Hasenmaier B, Dohlemann C, Meitinger T, Vosberg HP. De novo mutations in the beta-myosin gene causes hypertrophic cardiomyopathy [abstract]. *J Mol Cell Cardiol* 29: A46, 1997
- 34) Thierfelder L, Watkins H, MacRae C, Lamas R, McKenna W, Vosberg HP, Seidman JG, Seidman CE. Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 77: 701-712, 1994
- 35) Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L, Suk HJ, Anan R, O'Donoghue A, Spirito P, Matsumori A, Moravec CS, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl*

J Med 332: 1058-1064, 1995

- 36) Watkins H, Anan R, Coviello DA, Spirito P, Seidman JG, Seidman CE. A de novo mutation in alpha-tropomyosin that causes hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 91: 2302-2305, 1995
- 37) Watkins H, Conner D, Thierfelder L, Jarcho JA, MacRae C, McKenna WJ, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 11: 434-437, 1995
- 38) Bonne G, Carrier L, Bercovici J, Cruaud C, Richard P, Hainque B, Gautel M, Labeit S, James M, Beckmann J, Weissenbach J, Vosberg Hp, Fiszman M, Komajda M, Schwartz K. Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 11: 438-440, 1995
- 39) Carrier L, Bonne G, Bahrend E, Yu B, Richard P, Niel F, Hainque B, Cruaud C, Gary F, Labeit S, Bouhour JB, Dubourg O, Desnos M, Hagege AA, Trent RJ, Komajda M, Fiszman M, Schwartz K. Organization and sequence of human cardiac myosin binding protein C gene (MYBPC3) and identification of mutations predicted to produce truncated proteins in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 80: 427-434, 1997
- 40) Poetter K, Jiang H, Hassanzadeh S, Master SR, Chang A, Dalakas MC, Rayment I, Sellers JR, Fananapazir L, Epstein ND. 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
- 41) Kimura A, Harada H, Park JE, Nishi H, Satoh M, Takahashi M, Hiroi S, Sasaoka T, Ohbuchi N, Nakamura T, Koyanagi T, Hwang TH, Choo JA, Chung KS, Hasegawa A, Nagai R, Okazaki O, Nakamura H, Matsuzaki M, Sakamoto T, Toshima H, Koga Y, Imaizumi T, Sasazuki T. Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 16: 379-382, 1997
- 42) Mogensen J, Klausen IC, Pedersen AK, Egeblad H, Bross P, Kruse TA, Gregersen N, Hansen PS, Baandrup U, Borglum AD. Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 103: R39-43, 1999
- 43) Satoh M, Takahashi M, Sakamoto T, Hiroe M, Marumo F, Kimura A. Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 411-417, 1999
- 44) Maron BJ, Gottdiener JS, Epstein SE. Patterns and significance of distribution of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy. A wide angle, two dimensional echocardiographic study of 125 patients. *Am J Cardiol* 48: 418-428, 1981
- 45) Yamaguchi H, Ishimura T, Nishiyama S, Nagasaki F, Nakanishi S, Takatsu F, Nishijo T, Umeda T, Machii K. Hypertrophic nonobstructive cardiomyopathy with giant negative T waves (apical hypertrophy): ventriculographic and echocardiographic features in 30 patients. *Am J Cardiol* 44: 401-412, 1979
- 46) Maron BJ. Apical hypertrophic cardiomyopathy: the continuing saga. *J Am Coll Cardiol* 15: 91-93, 1990
- 47) Rokey R, Kuo LC, Zoghbi WA, Limacher MC, Quinones MA. Determination of parameters of left ventricular diastolic filling with pulsed Doppler echocardiography: comparison with cineangiography. *Circulation* 71: 543-550, 1985
- 48) Fananapazir L, Epstein ND. Genotype-phenotype correlations in hypertrophic cardiomyopathy. Insights provided by comparisons of kindreds with distinct and identical beta-myosin heavy chain gene mutations. *Circulation* 89: 22-32, 1994
- 49) Pouleur H, Rousseau MF, van Eyck C, Brasseur LA, Charlier AA. Force-velocity-length relations in hypertrophic cardiomyopathy: evidence of normal or depressed myocardial contractility. *Am J Cardiol* 52: 813-817, 1983
- 50) Ten Cate FJ, Roelandt J. Progression to left ventricular dilatation in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Am Heart J* 97: 762-765, 1979
- 51) Spirito P, Maron BJ, Bonow RO, Epstein SE. Occurrence and significance of progressive left ventricular wall thinning and relative cavity dilatation in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 60: 123-129, 1987
- 52) Maron BJ, Wolfson JK, Epstein SE, Roberts WC. Intramural ("small vessel") coronary artery disease in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 8:5545-557., 1986
- 53) Tanaka M, Fujiwara H, Onodera T, Wu DJ, Matsuda M, Hamashima Y, Kawai C. Quantitative analysis of narrowings of intramyocardial small arteries in normal hearts, hypertensive hearts, and hearts with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 75: 1130-1139, 1987
- 54) Fighali S, Krajcer Z, Edelman S, Leachman RD. Progression of hypertrophic cardiomyopathy into a hypokinetic left ventricle: higher incidence in patients with midventricular obstruction. *J Am Coll Cardiol* 9: 288-294, 1987
- 55) Kawano S, Iida K, Fujieda K, Yukisada K, Magdi ES, Iwasaki Y, Tabei F, Yamaguchi I, Sugishita Y. Response to isoproterenol as a prognostic indicator of evolution from hypertrophic cardiomyopathy to a phase resembling dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 25: 687-692, 1995
- 56) Jaaskelainen P, Soranta M, Miettinen R, Saarinen L, Pihlajamaki J, Silvennoinen K, Tikanoja T, Laakso M, Kuusisto J. The cardiac beta-myosin heavy chain gene is not the predominant gene for hypertrophic cardiomyopathy in the Finnish population. *J Am Coll Cardiol* 32: 1709-1716, 1998
- 57) Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyrfas I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93: 841-842, 1996
- 58) Vandenplas S, Wiid I, Grobler-Rabie A, Brebner K, Ricketts M, Wallis G, Bester A, Boyd C, Mathew C. Blot hybridisation analysis of genomic DNA. *J Med Genet* 21: 164-172, 1984
- 59) Beaucage SI, Caruthers MH. Deoxynucleoside

- phosphoramidites—a new class of key intermediates for deoxynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett* 22: 1859-1862, 1982
- 60) Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166, 1986
- 61) Kimura A. Symposium on gene abnormalities in medical diseases. 3. Molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy in Japan. *Intern Med* 36: 152-154, 1997
- 62) Kimura A, Harada H, Satoh M, Hiroi S, Sasaoka T, Takahashi M, Nakamura T, huchi N, Arimura T. Frequency and geographic distribution of mutations in the HCM genes found in Oriental familial hypertrophic cardiomyopathy [abstract]. *Japanese Circulation Journal* 62 (supple 1): IS034, 1998
- 63) Semsarian C, Yu B, Ryce C, Lawrence C, Washington H, Trent RJ. Sudden cardiac death in familial hypertrophic cardiomyopathy: are “benign” mutations really benign? *Pathology* 29: 305-308, 1997
- 64) Kato M, Takazawa K, Kimura A, Ruegg JC, Amano K, Wang Y, Sakaki Y, Toyo-oka T. Altered actin binding with myosin mutation in hypertrophic cardiomyopathy and sudden death. *Lancet* 345: 1247, 1995
- 65) Bundgaard H, Havndrup O, Andersen PS, Larsen LA, Brandt NJ, Vuust J, Kjeldsen K, Christiansen M. Familial hypertrophic cardiomyopathy associated with a novel missense mutation affecting the ATP-binding region of the cardiac beta-myosin heavy chain. *J Mol Cell Cardiol* 31: 745-750, 1999
- 66) Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. *Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults*. *Circulation* 92: 785-789, 1995
- 67) Maron BJ, Shirani J, Poliac LC, Mathenge R, Roberts WC, Mueller FO. Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles. *Jama* 276: 199-204, 1996
- 68) Maron BJ, Roberts WC, McAllister HA, Rosing DR, Epstein SE. Sudden death in young athletes. *Circulation* 62: 218-229, 1980
- 69) Maron BJ, Spirito P, Wesley Y, Arce J. Development and progression of left ventricular hypertrophy in children with hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 315: 610-614, 1986
- 70) Spirito P, Maron BJ. Absence of progression of left ventricular hypertrophy in adult patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 9: 1013-1017, 1987
- 71) Spirito P, Seidman CE, McKenna WJ, Maron BJ. The management of hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 336: 775-785, 1997
- 72) Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S, Watkins H, Chudley AE, McKenna W, Kristinsson A, Roberts R, Sole M, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 338: 1248-1257, 1998
- 73) McKenna WJ, Stewart JT, Nihoyannopoulos P, McGinty F, Davies MJ. Hypertrophic cardiomyopathy without hypertrophy: two families with myocardial disarray in the absence of increased myocardial mass. *Br Heart J* 63: 287-290, 1990
- 74) Al-Mahdawi S, Chamberlain S, Chojnowska L, Michalak E, Nihoyannopoulos P, Ryan M, Kusnierczyk B, French JA, Gilligan DM, Cleland J, Williamson R, Ruzyllo W, Oakley C. The electrocardiogram is a more sensitive indicator than echocardiography of hypertrophic cardiomyopathy in families with a mutation in the MYH7 gene. *Br Heart J* 72: 105-111, 1994
- 75) Ryan MP, Cleland JG, French JA, Joshi J, Choudhury L, Chojnowska L, Michalak E, al-Mahdawi S, Nihoyannopoulos P, Oakley CM. The standard electrocardiogram as a screening test for hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 76: 689-694, 1995
- 76) Geisterfer-Lowrance AA, Christe M, Conner DA, Ingwall JS, Schoen FJ, Seidman CE, Seidman JG. A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Science* 272: 731-734, 1996
- 77) Koga Y, Toshima H, Kimura A, Harada H, Koyanagi T, Nishi H, Nakata M, Imaizumi T. Clinical manifestations of hypertrophic cardiomyopathy with mutations in the cardiac beta-myosin heavy chain gene or cardiac troponin T gene. *J Card Fail* 2: S97-S103, 1996

Molecular Genetic Analysis of Familial Hypertrophic Cardiomyopathy With Mutations in the Cardiac β -Myosin Heavy Chain Yorito Emoto, Department of Molecular Genetics of Cardiovascular Disorders, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 – J. Juzen Med Soc., **110**, 227 – 242 (2001)

Key words hypertrophic cardiomyopathy, cardiac β -myosin heavy chain gene, gene mutation, sarcomere, sudden death

Abstract

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a primary disorder of the myocardium characterized by disproportionate ventricular hypertrophy and non-dilated ventricle associated with myocardial disarray and diastolic dysfunction. More than half of the patients have family histories transmitted as an autosomal dominant genetic trait. The results of molecular genetic studies have shown that HCM is a genetically heterogeneous disease involving mutations in at least 9 different genes encoding proteins of cardiac sarcomere such as cardiac β -myosin heavy chain (β MHC), cardiac troponin T and cardiac myosin binding protein C. The missense mutations in cardiac β MHC gene have been reported as the most common causes of HCM and have been identified in approximately 20 ~ 30 % of HCM patients. However, there are still gaps in our knowledge of the frequency of HCM cases caused by the cardiac β MHC gene and the clinical manifestations and prognoses related to each genotype. In this study, HCM probands from 168 unrelated families in the Hokuriku district of Japan were searched for further mutations in the cardiac β MHC gene. Genomic DNA samples were obtained from the peripheral WBC of the patients. Mutation analysis of the cardiac β MHC gene was performed from exon 3 to 24, and each 22 exon was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with 23 pairs of oligonucleotide primers. Variant conformers were detected by PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and mutations were identified by direct sequencing. The missense mutations were confirmed by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Four novel missense mutations: Ala200Thr, Gly733Glu, Met822Leu and Arg858Cys were identified. In total, 7 different mutations were identified in 10 probands including 3 previously reported missense mutations: Ala26Val, Arg870Cys and Glu935Lys. The frequency in HCM, 6.0 %, was far lower than the previous reports. Among these mutations, Gly733Glu, Arg858Cys, Arg870Cys and Glu935Lys were associated with the charge alteration. Structural aspects showed that Ala200Thr was near the ATP binding site, Gly733Glu was near the actin binding site, and Met822Leu, Arg858Cys and Arg870Cys were near the myosin binding site. Families of the probands with mutations were further evaluated both genetically and clinically. One member in the family with Gly733Glu and two members in the family with Met822Leu showed left ventricular dilatation and systolic dysfunction. Sudden cardiac death had occurred in the families with Met822Leu, Arg858Cys and Arg870Cys. These observations suggest that the clinical manifestations and prognoses are more closely related to the locations of the mutations than to the charge alterations.